

VERGLEICH GASCHROMATOGRAPHISCHER UND
PHOTOMETRISCHER MESSMETHODEN ZUM
QUALITATIVEN UND QUANTITATIVEN NACHWEIS
VON BARBITURATEN IN BLUT UND GEWEBE

CÄCILIA WEHWECK

1985

Diss.
München

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang Spann

Vergleich gaschromatographischer und photometrischer
Meßmethoden zum qualitativen und quantitativen Nachweis
von Barbituraten in Blut und Gewebe

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Cäcilia Wehweck

aus
Schleching

1985



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554620_0062

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität
München

Berichterstatter: PD Dr. L. v. Meyer

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 26. März 1985

Für die Bereitstellung des Themas sowie der ständigen fachkundigen Förderung bei der Entstehung dieser Arbeit danke ich Herrn Priv. Doz. Dr. L. v. Meyer vom Institut für Rechtsmedizin der Universität München.

Herr Prof. Dr. W. Spann, Direktor des Rechtsmedizinischen Instituts München, hat in großzügiger Weise durch Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und von Untersuchungsmaterial diese Arbeit ermöglicht. Ihm und allen wissenschaftlichen Mitarbeitern seines Instituts gilt mein besonderer Dank.

MEINEN ELTERN GEWIDMET

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG
2. BARBITURATE
 - 2.1. Chemie
 - 2.2. therapeutische und mißbräuchliche Verwendung
3. AUFGABENSTELLUNG
4. METHODEN DES BARBITURATNACHWEISES IN DER LITERATUR
 - 4.1. Säulenextraktion
 - 4.1.1. Extraktion über Amberlite XAD - Harz
 - 4.1.2. Extraktion über Extrelut^R - Säulen
 - 4.1.3. Vergleich der qualitativen und quantitativen Ergebnisse nach Extraktion über XAD - Säulchen und Extrelut^R - Säulen
 - 4.2. Lösungsmittel zur Elution
 - 4.2.1. chemische Zusammensetzung
 - 4.2.2. Lösungsmittelbedarf
 - 4.2.3. Lösungsmittelflußrate
 - 4.3. pH - Wert bei Elution
 - 4.4. Gewebsuntersuchungen von Leber und Lunge
 - 4.4.1. Bedeutung von Leber- und Lungengewebe für die toxikologische Analyse
 - 4.4.2. Methoden der Gewebeextraktion
 - 4.4.3. Verluste bei Gewebeextraktion
 - 4.5. Spektrophotometrie
 - 4.5.1. spektrophotometrisches Verhalten der Barbiturate
 - 4.5.2. spektrophotometrische Methoden der qualitativen und quantitativen Barbituratbestimmung
 - 4.5.3. photometrisch interferierende Substanzen
 - 4.5.4. Beurteilung der Photometrie
 - 4.6. Gaschromatographie
 - 4.6.1. Trennung von Barbitursäuren nach geeigneter Derivatisierung
 - 4.6.2. Trennung von Barbitursäuren ohne Derivatisierung
 - 4.6.3. Vor- und Nachteile der Chromatographie derivatisierter Barbiturate

- 4.6.4. Variationen gaschromatographischer Bedingungen
- 4.6.5. Methoden der quantitativen Bestimmung
- 4.6.6. gaschromatographisch interferierende Substanzen
- 4.7. Vergleich quantitativer Ergebnisse von Gaschromatographie und Photometrie

5. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

- 5.1. Material
 - 5.1.1. Sektionskollektiv
 - 5.1.2. Materialgewinnung
- 5.2. Methode
 - 5.2.1. Aufbereitung des Probenmaterials
 - 5.2.2. Herstellung der Analysenproben und Säulenextraktion
 - 5.2.3. Elution
 - 5.2.4. Spektrophotometrie
 - 5.2.5. Gaschromatographie
 - 5.2.6. Identifizierung
 - 5.2.7. quantitative Bestimmung

6. ERGEBNISSE

- 6.1. Ermittlung von Barbituratkonzentrationen anhand gaschromatographisch gewonnener Eichkurven
- 6.2. Überprüfung der photometrischen Genauigkeit
- 6.3. Anwendung unserer Methoden auf Fallbeispiele

7. DISKUSSION

- 7.1. Extraktion
 - 7.1.1. Extraktion underivatisierter Barbiturate
 - 7.1.2. Reinheit des Säulenharztes
 - 7.1.3. Harzmenge bei XAD - 2 Extraktion
 - 7.1.4. pH - Wert bei Elution
 - 7.1.5. Lösungsmittelfluß
 - 7.1.6. Extraktion vor UV - Analyse
- 7.2. Gewebeextraktion
 - 7.2.1. Probenmenge
 - 7.2.2. Proteinbindung
 - 7.2.3. Extraktion über XAD - 2 Harz
- 7.3. photometrische Genauigkeit

- 7.4. Gaschromatographie
 - 7.4.1. stationäre Phase
 - 7.4.2. interner Standard
 - 7.4.3. gaschromatographisch gewonnene Eichkurven
- 7.5. Vergleich der photometrisch und gaschromatographisch erhaltenen Ergebnisse
- 7.6. Diskussion der Fallbeispiele
- 8. ANHANG: DATEN ZU DEN BEARBEITETEN BARBITURATEN
 - 8.1. Cyclobarbital
 - 8.2. Hexobarbital
 - 8.3. Barbital
- 9. ZUSAMMENFASSUNG
- 10. LITERATURVERZEICHNIS
- 11. LEBENSLAUF

1. EINLEITUNG

Am 1. Januar 1984 wurde erstmals eine Reihe von Barbituratpräparaten unter das Betäubungsmittelgesetz gestellt. Damit wird einer jahrzehntelangen Entwicklung Rechnung getragen, in der diese Gruppe von Schlafmitteln bei Vergiftungsfällen, Selbstmorden und Suchtproblemen immer mehr in den Vordergrund tritt.

Im Untersuchungsgut des Rechtsmedizinischen Instituts München werden in den Jahren 1975 - 79 fast 75 % aller Einfachintoxikationen durch die Einnahme von Schlafmitteln hervorgerufen (103).

Unter dem Begriff "Schlafmittel" sind zusammengefaßt

- bromhaltige (z. B. Bromural^R, Adalin^R)
- barbiturathaltige (z. B. Phanodorm^R, Veronal^R)
- aliphatische (z. B. Chloralhydrat^R, Paraldehyd^R)
- sonstige, wie Piperidindione (z. B. Noludar^R) und Chinazolonderivate (z. B. Revonal)

Dieses vielfältige Angebot an Schlafmitteln entsteht erst im Laufe der letzten achtzig Jahre:

1864 synthetisiert A. v. BAEYER die Barbitursäure (38), die keine narkotische Wirkung aufweist. Bis 1899 ist als einziges Schlafmittel Chloralhydrat auf dem Markt (40).

1903 führen FISCHER und v. MEHRING Barbitol als erstes barbiturathaltiges Schlafmittel ein (18). Ab 1910 sind Carbromal (Adalin^R) und andere Bromharnstoffderivate rezeptfrei erhältlich (10).

1912 erscheint Phenobarbital auf dem Markt (82, 98), 1932 folgen Butobarbital (3) und Hexobarbital (32).

Heute sind allein bei den Barbituraten über 2500 Substanzen synthetisiert, mehr als 50 davon werden auf dem Weltmarkt angeboten (36). Von diesen werden wiederum etwa ein Dutzend in größerem Umfang verwendet (38).

Mit der pharmakologischen Entwicklung der Schlafmittel tritt ein Wandel in der Vergiftungsszene auf:

Nach einer Untersuchung von BRANDT (12) steigt in den Jahren 1915 - 74 im Sektionsgut des Instituts für Rechtsmedizin München nicht nur die absolute Zahl von Intoxikationen, sondern auch deren relativer Anteil an der Gesamtzahl der Suizide. Gleichzeitig kommt es zwischen den Gruppen der Schlafmittel zu charakteristischen Verschiebungen in der Häufigkeit ihrer suizidalen Anwendung: In den 30er Jahren wird der Anteil der Barbitatvergiftungen an der Gesamtzahl der Schlafmittelintoxikationen mit 90 % angegeben (bei einem Anteil der Schlafmittel - an den Gesamtintoxikationen von 40 %) (82). Die Barbiturate stehen bis Ende der 50er Jahre an der Spitze der Hypnotikaintoxikationen (74, 99).

Nach einem sprunghaften Anstieg der mißbräuchlichen Verwendung barbituratfreier Mittel in den 60er Jahren werden diese konsequent unter Rezeptpflicht gestellt:

1960	Gluthetimid (Doriden ^R) (55)
1961/62	Pyrithyldion (Persedon ^R) (9, 82, 83)
Dez. 62	Methaqualon (Revonal ^R) (9, 82, 83)
1968	Methyprylon (Noludar ^R) (9, 82, 83)

Frei erhältlich bleiben zunächst die Bromharnstoffderivate, deren Verbrauch in den 70er Jahren stark ansteigt. So finden sich im Untersuchungsgut des Rechtsmedizinischen Instituts München im Jahr 1972 erstmals mehr Intoxikationen mit Bromureiden als mit Barbituraten (99, 103). Bis 1977 machen sie 2/3 aller Schlafmittelvergiftungen aus.

Nach Einführung der Rezeptpflicht am 1. Juli 1978 (103) fällt der Anteil der Bromcarbamid - an den Schlafmittelvergiftungen (nach Untersuchungen im Rechtsmedizinischen Institut München) im Jahr 1979 um über 50 % ihre Vorjahreswertes (103). An ihre Stelle treten andere Schlafmittel, wobei ein deutlicher Wiederanstieg von Barbituratvergiftungen festgestellt wird (103).

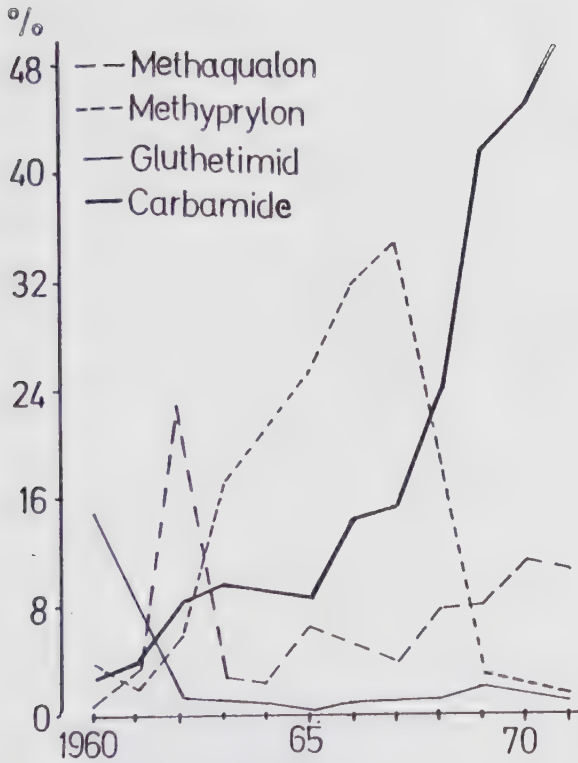


Abb. 1 : Statistische Übersicht eines Reanimationszentrums über Schlafmittelintoxikationen in den Jahren 1960 - 71 (aus LEMMER (57))

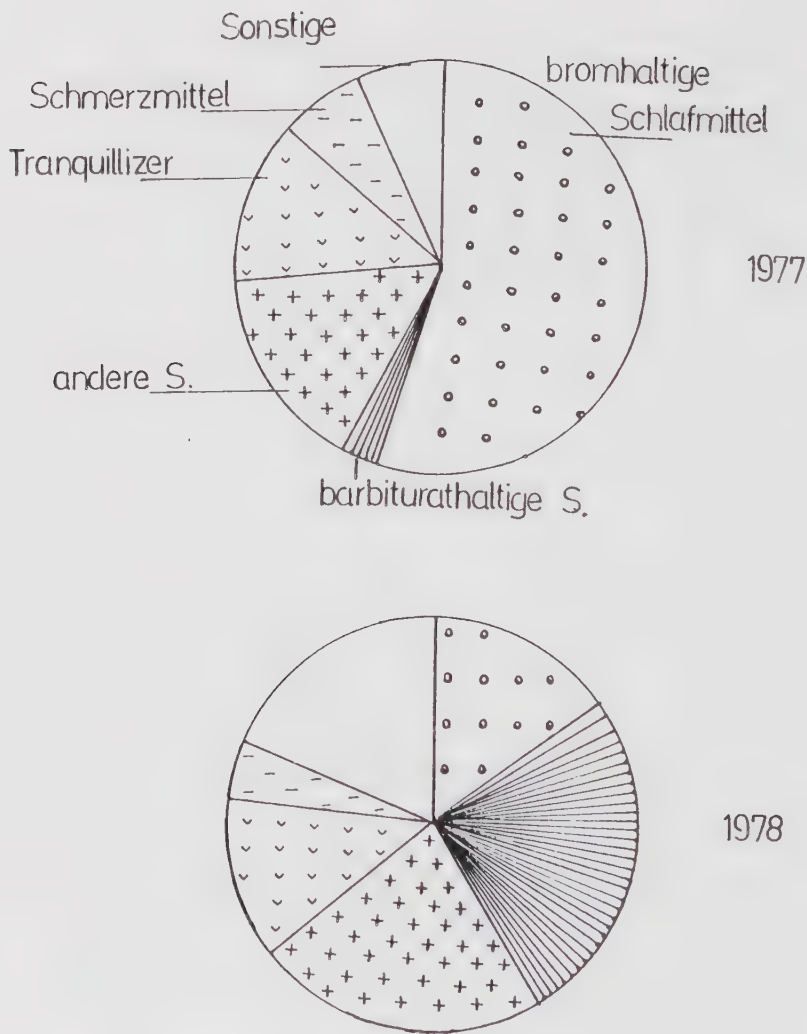


Abb. 2: Verteilung der bei Einfachintoxikationen eingenommenen Stoffe in den Jahren 1977 und 1978. Untersuchungsgut des Rechtsmedizinischen Instituts München (aus ZILLER (103))

2. BARBITURATE

2.1. Chemie

Das Ausgangsmolekül aller Barbiturate, die Barbitursäure, entsteht durch Kondensation von Harnstoff mit Malonsäure (erstmals synthetisiert von A. v. BAAYER 1863 (82)).

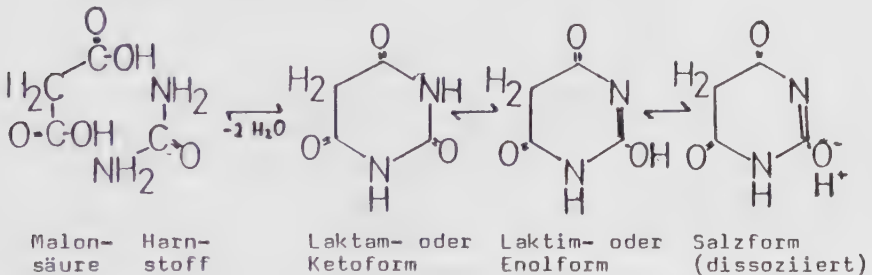


Abb. 3 : Synthese der Barbitursäure (aus FORTH et al.(32))

Substitutionsprodukte der Barbitursäure, die selbst nicht sedativ - hypnotisch wirksam ist, haben vielfältige Anwendungsmöglichkeiten als Hypnotika, Sedativa, Injektionsnarkotika und Antiepileptika. Durch das Einführen neuer Substituenten speziell an den Positionen 1,2 und 5,5' kann ihr chemisches Verhalten gezielt modifiziert werden.

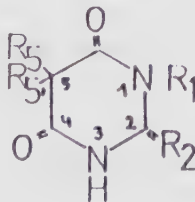


Abb. 4 : Substituenten des Barbitursäureringes (aus BROCHMANN - HANSEN (18))

Die Barbiturate für den klinischen Gebrauch lassen sich in folgende Gruppen einteilen (18):

5,5' - disubstituierte Barbitursäuren ($R_1=H$, $R_2=O$)
z.B. Diethylbarbitursäure (Barbital), Phenyl-
ethylbarbitursäure (Phenobarbital)
Die Verlängerung der Alkylketten in 5,5' erhöht
die Abbaugeschwindigkeit und die hypnotische
Wirkung (55, 82).

1,5,5' - substituierte Barbitursäuren ($R_2=O$)
z.B. 1,5 - dimethyl - cyclohexenylbarbitur-
säure (Hexobarbital)

5,5' - substituierte Thiobarbiturate (der Sauerstoff
in Position 2 ist durch Schwefel ersetzt)
z.B. 5 - ethyl, 5' - (1 - methyl, 1 - butyl),
2 - thiobarbitursäure (Thiopental)

Nach ihrer Wirkungsdauer unterteilt man Barbiturate in (38):

- langwirksame (über 6 Stunden Wirkdauer)
diese werden fast nicht metabolisiert und
größtenteils unverändert über die Nieren
ausgeschieden
z.B. Phenobarbital, Barbital
- mittellang wirksame (Wirkdauer 3 - 6 Stunden)
z.B. Amobarbital, Butobarbital
- kurzwirksame (Wirkdauer 1 - 3 Stunden)
diese weisen eine hohe Metabolisierungs-
rate auf und werden größtenteils in der
Leber abgebaut
z.B. Cyclobarbital, Pentobarbital
- ultrakurz wirksame
die Wirkung ist begrenzt durch Umvertei-
lung der Substanz aus dem Hirngewebe in
die Muskulatur und das Fettgewebe (Kumu-
lationsgefahr!)
z.B. Thiopental

Der enzymatische Abbau der Barbiturate erfolgt im endoplasmatischen Retikulum der Leberzelle durch Abspalten der Substituenten (Demethylierung, Desulfurierung, ..) und anschließender oxidativer Öffnung von Harnstoff- und Malonsäuregruppe (32, 75). Die Oxidationsprodukte sind hypnotisch - sedativ unwirksam und werden infolge verringerter Lipoidlöslichkeit schnell renal eliminiert.

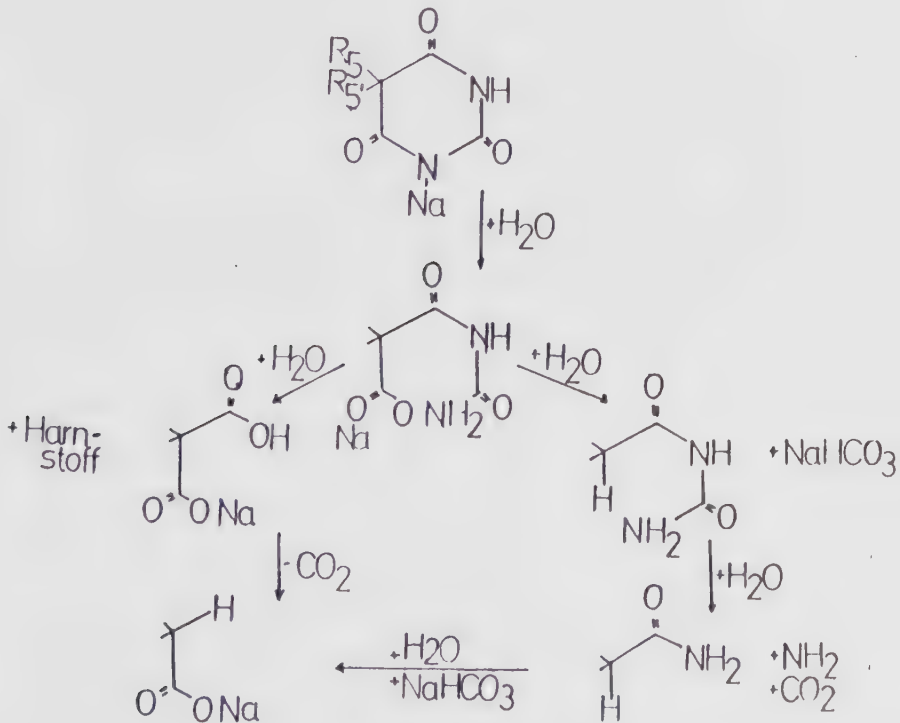


Abb. 5: Oxidativer Abbau der Barbitursäure (nach PERLIA (75))

Das chemische Verhalten der Barbiturate ist bestimmt durch ihren schwach sauren Charakter (pK_a - Wert 7,3 - 8,4) (32), den sie durch das Wasserstoffatom in Position 2 erhalten. Da freie Barbitursäuren nur in organischem Lösungsmittel löslich sind, müssen zur Herstellung wässriger Lösungen Salze verwendet werden. Diese entstehen durch Lösen der Barbitursäuren in alkalischen Flüssigkeiten (NaOH, KOH, ..). Therapeutisch wichtig sind vor allem Na - Salze und Diethylaminsalze (55). In wässrigen Lösungen reagieren die Salze stark alkalisch (z.B. Hexobarbital - Na 2,5 % pH 10,5 (75)), In Abhängigkeit von den Substituenten sind die Derivate unterschiedlich lipophil (Phenobarbital < Hexobarbital < Thiopental). Mit zunehmender Lipoidlöslichkeit setzt die narkotische Wirkung schneller ein, erfolgt die enterale Resorption schneller, ist die Plasmaeiweißbindung erhöht, ist die Metabolisierungsrate erhöht und verringern sich Halbwertszeit und Wirkdauer und wird weniger unverändert im Urin ausgeschieden (32).

2.2. Therapeutische und mißbräuchliche Verwendung

Therapeutischer Einsatz

Die Barbiturate sind nach den aliphatischen Schlafmitteln die älteste Gruppe und finden heute in der Medizin eine vielseitige Anwendung. Aufgrund ihrer krampflösenden Wirkung, die sie neben ihrer schlaffördernden Eigenschaft noch besitzen, werden sie eingesetzt zur Therapie bei Tetanus, Epilepsie und Eklampsie. Barbiturate induzieren die Aktivität der Leberglucuronyltransferase und fördern damit die Bilirubinausscheidung. Ihr Einsatz erfolgt bei Hyperbilirubinämie und Kernikterus (38). Die Hirnödemtherapie beinhaltet die Verabreichung hoher Barbituratdosen.

Abusus

Voraussetzung für die Entwicklung einer Schlafmittelsucht scheint zufolge mehrerer Autoren (39, 49) eine labile psychoneurotische oder psychopathische Persönlichkeitsstruktur. Die chronische Einnahme kommt dabei auf mehreren Wegen zustande. Möglich ist u.a. die Gewöhnung während der Therapie oder ein Suchtwechsel in der Folge eines chronischen Alkoholismus.

Die WHO definiert den Typ der Barbituratabhängigkeit und subsummiert darunter zentral dämpfende Pharmaka, bei deren chronischer Anwendung sowohl eine psychische als auch physische Abhängigkeit auftritt. Bei längerdauerndem Abusus entwickelt sich (u.a. infolge einer mikrosomalen Enzyminduktion und einer damit gesteigerten Metabolisierungsrate in der Leber - nachgewiesen für Phenobarbital und Hexobarbital (32, 34)) eine Toleranz, die sich darin äußert, daß bei gleichbleibender Dosis eine Schlafverkürzung auftritt, die wiederum Anlaß zu einer Dosissteigerung gibt (32, 49). Bei einigen Patienten wird paradoxerweise ein aktivierender, stimmungshebender Effekt gefunden (49); in diesen Fällen können Barbiturate auch als Stimulantien mißbräuchlich ver-

wendet werden. Soweit bisher bekannt, hinterläßt chronische Barbiturateinnahme keine organischen Schäden (39), äußert sich jedoch in psychischen Symptomen wie Benommenheit, Koordinationsstörungen, Affektlabilität, Einschränkung von Auffassungs- und Wahrnehmungsfähigkeit, in neurologischen Erscheinungen und in Dermatosen (Urtikaria, Dermatitis exfoliata) (36, 49, 55).

Akute Entzugskonvulsionen wurden erstmals von POLISH 1928 beschrieben (55). Weiterhin zeigt sich die physische und psychische Abhängigkeit in Abstinenzsymptomen wie Schlaflosigkeit, Halluzinosen, akuten Psychosen, epileptischen Anfällen und Muskelfaszikulieren und -tremor (49, 55).

Intoxikation

Bei akuter Überdosierung macht sich die allen Hypnotika gemeinsame Lähmung von Zellfunktionen bemerkbar. Die Inaktivierung medullärer Zentren steht dabei im Vordergrund: Reflexverlust (mit möglicher Entwicklung einer Aspirationspneumonie)

Herz - Kreislaufversagen

Atemlähmung

Bewußtlosigkeit.

Relativ charakteristisch sind ferner eine β - Aktivierung des EEG, eine sich entwickelnde Hypothermie und bullöse Abhebungen der Epidermis an Auflagestellen (27, 32, 38, 49, 55).

Therapie der Barbituratvergiftung

Die Therapie der akuten Intoxikation besteht neben der Aufrechterhaltung der vitalen Funktionen in sofortigem Erbrechenlassen und - sollte die Ingestion nicht älter als etwa 4 Stunden sein - in Magenspülungen (38). Eine systemische Antibiotikagabe dient der Pneumonieprophylaxe. Zur schnelleren Senkung des Serummedikamentenspiegels eignen sich eine forcierte alkalische Diurese und - bei Anurie und akut bedrohlichen Serumkonzentrationen - die Hämodialyse, die wiederum wirkungsvoller bei Barbituraten mit geringer Proteinbindung eingesetzt werden kann (34).

Bei chronischer Intoxikation ist auf einen langsamen Entzug zu achten (14 - 21 Tage) und eventuell eine Psychotherapie anzuschließen (39).

Prognose der Vergiftung

GOODMAN and GILMAN (38) geben bei Barbituratvergiftungen eine Mortalitätsrate von 0,5 - 12 % an, abhängig von Begleitumständen (wie etwa Zeitpunkt des Therapiebeginns) und Erfahrungheit des behandelnden Teams. Die Durchschnittswerte für letale Dosen (etwa das 10-fache der hypnotischen Dosis), therapeutische Blutspiegel (1 - 10 mg/l) und toxische Konzentrationen (15 - 100 mg/l) (37, 38) können nur als Anhalt dienen, da die Werte innerhalb der Barbiturate stark schwanken. So werden höhere Serummedikamentenspiegel bei langwirksamen Barbituraten toleriert: BAILEY et al. (1) empfehlen, bei Barbituratspiegel über 200 mg/l im Blut lebender Patienten zuerst an eine Barbitalintoxikation zu denken, die den längsten und schwersten Verlauf von allen Barbituratvergiftungen hat und die größte Todesquote aufweist (5,8 %, zum Vergleich 4,2 % bei Phenobarbital und 1,3 % bei Hexobarbital) (87). Die Wirkung kurzwirksamer Barbiturate setzt schneller ein und besitzt bei gleicher Serumkonzentration höhere Toxizität; im Langzeitverlauf weist diese Gruppe jedoch eine bessere Prognose auf. An der Spitze der zum Suizid benutzten Barbiturate stehen die therapeutisch am häufigsten verwendeten, wie Cyclo-, Pheno-, Seco-, Pento- und Brallobarbital. Auf diese Gruppe entfielen in den Jahren 1970 - 77 am Münchner Rechtsmedizinischen Institut 62 % der Vergiftungen (7).

3. AUFGABENSTELLUNG

Die überragende Bedeutung von Barbituraten in Vergiftungsfällen verlangt eine exakte qualitative und quantitative Bestimmung des beteiligten Arzneimittels. Diese Forderung stellt sowohl der forensische, als in besonderem Maße auch der klinische Toxikologe, von dessen schneller und exakten Diagnose die Behandlungsmethode und Prognose einer akuten Intoxikation abhängt. Da es heute für viele andere Substanzen schon spezifische Antidota gibt, ist eine frühe Weichenstellung wichtig: Liegt ein Barbiturat vor? Wenn ja, wie invasiv muß behandelt werden (Barbiturattyp? Blutspiegel?).

In der forensischen Medizin stellt sich zudem noch die Aufgabe, den Zeitraum abzuschätzen zwischen Ingestion und Eintritt des Todes. Dazu wurden bisher hauptsächlich die Barbituratkonzentrationen im Mageninhalt (bei oraler Applikation), im Blut und im Urin bestimmt. Nur wenige Forscher dehnten ihre Untersuchungen auf andere Körpergewebe aus.

Aufgabe unserer Versuche ist es,

- a) eine einfache, wenig Ausgangsmaterial und Reagenzien benötigende und schnelle Methode zu finden, um Barbiturate aus Blut- und Gewebeproben zu isolieren;
- b) eine Methode zu entwickeln, Organe möglichst zeitsparend aufzuarbeiten, um Gewebespiegel bestimmen zu können;
- c) durch Kombination von gaschromatographischer und photometrischer Bestimmung ein Verfahren zum quantitativen und qualitativen Nachweis von Barbituraten zu erhalten.

4. METHODEN DES BARBITURATNACHWEISES IN DER LITERATUR

4.1. Säulenextraktion

Alternativ zur Extraktion von Substanzen nach der herkömmlichen flüssig - flüssig Methode bietet sich seit etwa 15 Jahren das Verfahren der Extraktion mit Hilfe der Säulenchromatographie.

4.1.1. Extraktion über Amberlite XAD - Harz

Nachdem FUJIMOTO und WANG 1970 (35) das erste Mal über den Gebrauch von Säulenchromatographie mit XAD - 2 Harz zur qualitativen Isolierung von narkotisch wirksamen Analgetika aus Urin berichten, wird die Methode der Adsorption an nicht - ionisches XAD - 2 Harz von anderen Autoren auch zur quantitativen Bestimmung angewendet (5, 51, 52, 68). Die befriedigenden Ergebnisse über Praktikabilität und Wiederfindungsraten ziehen weitere Untersuchungen über qualitative und quantitative Anwendungsmöglichkeit dieser Methode auf Blut nach sich (35, 66). So finden MACHATA et al. (60) bei gaschromatographischer Auftrennung von Blutextrakten eine wesentlich geringere Verunreinigung der Proben durch stickstoffhaltige Begleitsubstanzen nach XAD - 4 Elution gemessen an der Eiweißfällung mit Aceton. Einen Schritt weitergehend, publizieren mehrere Autoren unabhängig voneinander Routinemethoden zur Säulenextraktion von Arzneimitteln aus Gewebshomogenaten (11, 42, 78, 79, 89).

Wirkprinzip: Amberlite XAD - Harz besteht aus Styrol-Divinylbenzol - Polymeren. Wegen seines nicht - ionischen Charakters und seiner großen Oberfläche kann es neben lipophilen auch viele wasserlösliche organische Verbindungen durch hauptsächlich van - der - Waalsche Kräfte adsorbieren (35).

Bei der Elution werden diese Bindungen getrennt und die Substanzen vom Lösungsmittel ausgeschwemmt.

XAD - Säulchen besitzen ein Probenaufnahmevermögen von 20 ml.

Aufbereitung von XAD - Harz: Vor dem Einsatz von XAD - Harz zur Extraktion aus biologischem Material sollte es gut gewaschen werden, um die Analyse störende, interferierende Substanzen zu entfernen. In der Literatur werden verschiedene Arten der Aufbereitung vorgeschlagen. Sie zeigen alle ein gutes Resultat.

MULE et al. (68) waschen das Harz mit 4 mal dem 4-fachen Teil Aceton, 3 mal dem 3-fachen Teil Methanol und destilliertem Wasser. Das Harz bleibt bis zum Gebrauch in destilliertem Wasser. Irreversible Adsorption der untersuchten Substanzen an das Harz soll dadurch vermieden werden.

BASTOS (5) benutzt ebenfalls in destilliertem Wasser gelagertes Harz, das vor Benutzung noch 1 - 2 mal mit destilliertem Wasser gewaschen wird. Er erreicht damit eine verbesserte Ausbeute von z.B. 12,6 % für Phenobarbital im Vergleich zur Elution über frisch gewaschenes Harz.

MACHATA et al. (60) empfehlen, 10 - 15 g feuchtes Harz in einer Säule mit 200 ml Aceton langsam zu spülen und mit ebensoviel destilliertem Wasser nachzuwaschen.

PRANITIS et al. (78) lagern das Harz vor Gebrauch für 24 Stunden in destilliertem Wasser, füllen dann die Säulen mit dem nassen Harz und waschen nochmals mit 100 ml destilliertem Wasser, 100 ml Methanol und wieder 100 ml destilliertem Wasser. Bis zur Verwendung verschließen sie die Säule, um eine Austrocknung des Harzes zu vermeiden.

STAJIC et al. (88) waschen das Harz unter ständigem Rühren eine Stunde lang mit drei Teilen Methanol. Das Methanol wird dabei zweimal erneuert. Dasselbe Vorgehen wird mit destilliertem Wasser wiederholt. Die Aufbewahrung des Harzes erfolgt mit Wasser versetzt im Kühlschrank.

Harzmenge bei Extraktion: IBRAHIM et al. (42) genügen für einen Extrakt aus 500 g Gewebe 1 - 2 g Harz, ohne daß eine Überladung des Harzes oder eine Störung der Analyse infolge Verunreinigungen auftritt. Demgegenüber verwenden PRANITIS et al. (78) bereits 12 g Harzaufschwemmung zur Extraktion aus 10 ml Blut.

Bei Untersuchungen über Extraktionsraten für Barbiturate erreichen STAJIC et al. (88) bei Variation der Harzmenge eine Ausbeute von 73 - 75 % (Pentobabital) bei Einsatz von 5 - 20 g Harz. Eine ähnlich hohe Adsorptionsrate finden KULLBERG et al. (51) bei Verwendung von nur 2 g Harz im Konzentrationsbereich 0,5 - 500 mg/l Phenobarbital (71 - 75 %). Zur Vermischung von Harz und Probenmaterial sind zwei verschiedene Vorgehen möglich:

- die Probe wird auf das Harz gegossen und die Substanzen, während die Flüssigkeit durch die Säule läuft, an das Harz gebunden
- die Probe wird mit dem Harz vermischt und die Probe - Harzaufschwemmung in ein zuvor geleertes XAD-Säulchen geschüttet.

4.1.2. Extraktion über Extrelut^R-Säulen

1976 stellten BREITER et al. (14) erstmals die Extraktion mit der Extrelut^R-Säule vor. In ihren Untersuchungen zeigt sich im Vergleich von Extrelut^R- mit konventioneller flüssig - flüssig Extraktion nach der ersten Elution eine Ausbeute für Barbiturate von 81 % (im Vergleich zu 69 %) bei einer Gesamtausbeute von 97 % (im Vergleich zu 94 %).

Diese Methode findet in den folgenden Jahren breite Anwendung in der Toxikologie, pharmazeutischen Qualitätskontrolle, Pharmakokinetik u. a. Auf dem Gebiet der Barbituratbestimmung im Blut befassen sich damit auch SCHWEIZER et al. (84) und WERNER et al. (100).

Wirkprinzip: Säulen mit 50 ml Inhalt sind mit 14 g weitporigem Kieselguhr gefüllt. Auf diesem verteilt sich die Probe nach dem Aufgießen und überzieht als stationäre Phase die ganze poröse Matrixoberfläche. Bei der Elution mit einem organischen Lösungsmittel werden die lipophilen Substanzen aus der Wasser- in die organische Phase extrahiert (15). Die Elution stellt eine ständige Mikroextraktion dar, wobei sich zwischen stationärer Phase und Elutionsmittel ein immer neues Gleichgewicht der Substanzkonzentrationen einstellt.

Die Extrelut^R-Säule hat wie das XAD-Säulchen ein Aufnahmevolumen von 20 ml Probe. Bei geringerem Probenvolumen wird mit einem Verdünnungsmittel auf 20 ml aufgefüllt. Nach Verteilung der Probe auf der Säule (10 - 15 min) bleiben am unteren Ende der Säule etwa 10 % des Kieselguhrs trocken. Diese Zone garantiert eine emulsionsfreie Extraktion. Zur Elution werden 40 - 60 ml Lösungsmittel benötigt. Das Totvolumen der Säule beträgt 15 ml, so daß 25 - 45 ml Eluat erhalten werden. Die zur Elution benötigte Zeit ist auf 5 - 20 min angesetzt (15).

Aufbereitung von Extrelut^R-Säulenmaterial: Bei längerem Gebrauch der Säulen können Verunreinigungen der Proben auftreten durch Auslösen von Fettsäuren, höheren Alkoholen, Harzsäuren u.a. aus dem Säulenmaterial während der Elution (15). Die im Gaschromatogramm festgestellten relativ großen Mengen an störenden Harzsäuren entfernen ENDE et al. (29) durch 4-stündige Extraktion des Säulenmaterials mit Toluol, Aceton und Ethanol bzw. Methanol in einem Soxhlett-Apparat.

Vorteile der Extrelut^R-Extraktion: Als besondere Vorteile dieses Verfahrens werden genannt (30):

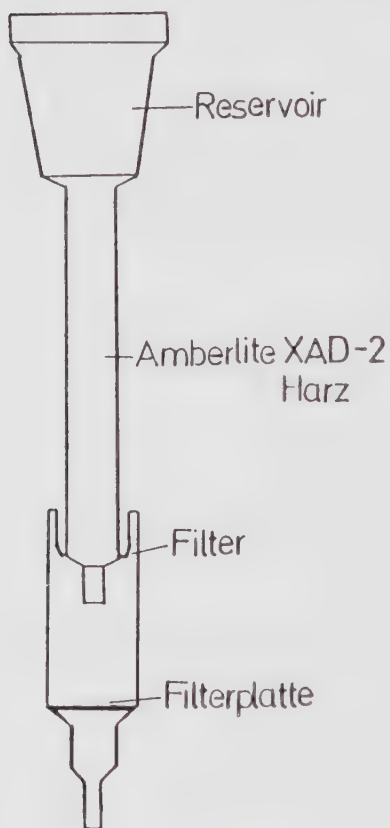
- Fehlen von Emulsionen
- hohe Wiederfindung und Präzision
- einfache und saubere Arbeitsweise
- geringerer Lösungsmittel- und Zeitbedarf
- höhere Reinheit der Extrakte im Vergleich zur flüssig - flüssig Extraktion.

4.1.3. Vergleich der qualitativen und quantitativen Ergebnisse von XAD-Säulchen und Extrelut^R-Säulen

Bei identischen quantitativen Ergebnissen ist mit der Extrelut^R-Methode die Reinheit der Extrakte größer als nach XAD-Extraktion (14). Die Nachweisgrenze für Barbiturate liegt bei Extrelut^R-Extraktion um 40 - 50 % niedriger.

VON MEYER et al. (65) weisen für die Extrelut^R-Methode eine im Durchschnitt größere Ausbeute nach. Die Wiederfindungsraten sind für Phenobarbital nach Extrelut^R-Extraktion 99 %, nach XAD-Extraktion nur 49 %. Die beschriebenen Substanzverluste bei XAD-Extraktion sind hauptsächlich zurückzuführen auf die starke Harzbindung: Mit der die Säule durchlaufenden wässrigen Phase gehen nur 1 - 2 % der Dosis verloren, der Rest wird fast vollständig an das Harz adsorbiert (91 - 97 %), im Eluat finden sich 86 - 92 % der Barbituratdosis wieder (52). Die Retention von 5 - 10 % der Barbituratdosis am XAD-Harz bestätigen Untersuchungen von MULE et al. (68) und STAJIC et al. (88).

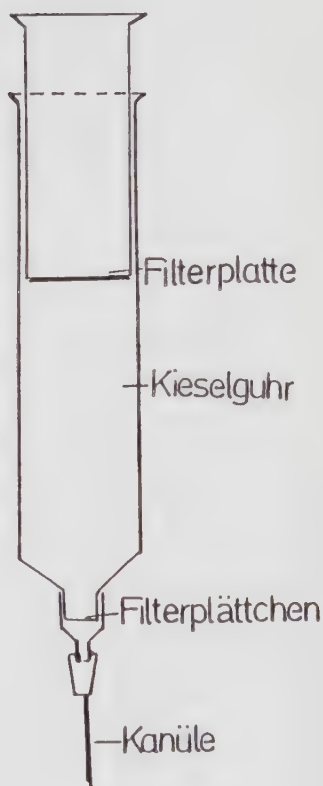
XAD-2 DRUG SCREEN^R



Fa. Brinkmann, U.S.A.

Länge: 11 cm

EXTRELUT^R



Fa. E. Merck, Darmstadt

16 cm

Abb. 6: Schematische Darstellung eines XAD - Säulchens und einer Extrelut^R - Säule

4.2. Lösungsmittel zur Elution

4.2.1. Chemische Zusammensetzung

Die Desorption von Substanzen von Harz kann prinzipiell erfolgen mit in Wasser mischbaren (Alkohol, Aceton) oder mit in Wasser nicht mischbaren Lösungsmitteln (wie Ether, Ester oder Kohlenwasserstoffen).

Durch Mischen von organischen Lösungsmitteln mit polaren Alkoholen wird die Extraktionseffektivität gesteigert.

Bei Elution mit Ethylacetat/Dichlorethylen 3:2 erreichen KULLBERG et al. (51) eine Wiederfindungsrate für Phenobarbital von 92 %, die sie durch Zusatz definierter Mengen Isopropanol zum Lösungsmittelgemisch bis 100 % steigern können. Bei Extraktion des gleichen Barbiturates mit Isopropylether erhalten BOGUSZ et al. (11) eine Ausbeute von 75 %, bei einer Mischung von Isopropylether mit Methanol im Verhältnis 3:1 dagegen 96 %. Jedoch stellen LANTZ et al. (53) bei ähnlichen Versuchen fest, daß mit Zunahme der Polarität des Extraktionsmittels das Hintergrundrauschen im Gaschromatogramm zunimmt. Zu beachten ist ferner, daß bei Einsatz von Extraktionsmitteln mit zu hohem Alkoholanteil die wässrige Phase der Probe eine Volumenvergrößerung erfährt, die zu einer Überladung der Säule und damit zur Emulsionsbildung führen kann.

Chloroform wird bei vielen Versuchen als Elutionsmittel bevorzugt. Es wird sowohl zur ungezielten Extraktion einer Vielzahl von Substanzen empfohlen (6, 31, 47), wie auch speziell zur Elution von Barbituraten (8, 15, 21, 41, 43, 50, 56, 72, 85, 95). PRANITIS et al. (79) setzen Chloroform zur Differentialelution saurer und neutraler Substanzen ein.

Im Vergleich mit Chloroform erzielen BREITER et al. (14) mit Ether nach Extrelut^R-Extraktion von Barbital eine um 2 % höhere Wiederfindung bei zusätzlich geringerem Lösungsmittelverbrauch (Wiederfindung steigt von 97 % auf 99 %).

Ebenfalls für Barbitol erhält BREITER (15) bei Verbrauch von gleichen Lösungsmittelmengen eine Ausbeute von 88 % mit Chloroform und 95 % mit Etherextraktion. Höhere Extraktionsausbeuten mit Ether im Vergleich zu Chloroform erreichen DOYLE et al. (28) bei allen Barbituratanalysen. Ether wird ebenfalls empfohlen zur Elution von Antiepileptika und Tranquillizern aus Blut (6, 25, 84, 101). Weitere zur Barbituratelution getestete Lösungsmittel sind Toluol (das weniger biologische Artefakte lösen soll (46, 58)), Ethylenchlorid (62), Petroleum-Amylalkohol 100:2 (13), Methylenchlorid (101) und Methanol (80). Trotz der höheren Extraktionsausbeuten mit Ether wird von vielen Autoren Chloroform als Elutionsmittel bevorzugt. Der Vorteil von Chloroform liegt in den wesentlich reineren Extrakten, wie KÜLPMANN (50) gaschromatographisch belegt und BERRY et al. (8) durch Bestimmung von im Extrakt vorliegenden Barbituratmetaboliten nachweisen (4 - 10 % Hydroxyamylbarbital im Chloroformextrakt, 40 - 50 % im Etherextrakt). Untersuchungen von SUNSHINE et al. (95) und ITIABA et al. (43) unterstützen diese Ergebnisse.

4.2.2. Lösungsmittelbedarf

Eine Zunahme der Elutionseffizienz mit steigenden Lösungsmittelmengen finden KULLBERG et al. (51). Bei Einsatz von mehr als 20 ml tritt jedoch keine signifikante Steigerung mehr ein.

4.2.3. Lösungsmittelflußrate

Eine langsame Flußrate ist die Voraussetzung für einen intensiven Kontakt von Probe, Harz und Elutionsmittel. STAJIC et al. (88) finden im Bereich 1,5 - 15 ml/min eine Ausbeute für Phenobarbital von 104 - 112 %. Eine Verringerung der Flußrate unter 15 ml/min bringt somit keine Verbesserung der Ergebnisse.

MULE et al. (68) erreichen durch eine kontrollierte Flußrate eine Ausbeutensteigerung von 51,1 auf 81,9 %, was einer Zunahme von mehr als 30 % entspricht.

4.3. pH - Wert bei Elution

Unterschiedliche pH - Werte des Säulenmilieus, aus dem eluiert wird, bewirken eine für jede Substanz unterschiedliche Extrahierbarkeit.

Bei Elution über XAD - Harz halten MACHATA et al. (60), MISSEN et al. (66) und PRANITIS et al. (78) einen physiologischen pH - Wert von 7,4 am geeignetsten zur gleichzeitigen Extraktion von sauren, neutralen und basischen Substanzen aus Blut. Als Screeningmethode ist die XAD - Extraktion bei pH 9 geläufig (5, 11, 42, 88).

Wie die meisten Arzneimittel unterliegen auch Barbiturate als Elektrolyte der Dissoziation. Aufgrund ihres schwach sauren pK_s -Wertes liegen sie in saurem Milieu vorwiegend undissoziiert vor. Daraus erklärt sich die gute Adsorption an die Trägersubstanz der XAD - Säulen (die unpolar ist und hauptsächlich nichtionische Teile adsorbiert) und die hohen Extraktionsausbeuten mit organischen Lösungsmitteln bei saurem pH - Wert (5, 11, 51, 68, 79, 80).

STAJIC et al. (88) erhalten bei Extraktion von Phenobarbital aus Wasser eine Wiederfindungsrate von 31% bei pH 9,5 gegenüber 73% bei pH 8,5 (XAD - Extraktion).

Bei Elution über Extrelut^R- Säulen erreichen MEYER, von et al. (65) sogar eine Phenobarbitalausbeute von 99% (pH 2) im Vergleich zu 46% (pH 9,5).

Obwohl die Wiederfindungsraten sowohl bei Säulenextraktion über XAD (88) und Extrelut^R (65) als auch bei flüssig - flüssig Extraktion (85) mit Abnahme des pH - Wertes ansteigen, bevorzugen viele Autoren die Elution bei einem pH - Wert von 7,4 (XAD - (35), flüssig-flüssig Extraktion - (31, 41, 62, 72, 95)), da unter sauren Bedingungen neben den Barbituraten auch andere Säuren (wie Salizylsäure) und Barbituratmetaboliten verstärkt extrahiert werden. Diese Substanzen können die Analyse stören bzw. eine weitere Reinigung des Extrakts nötig machen (95).

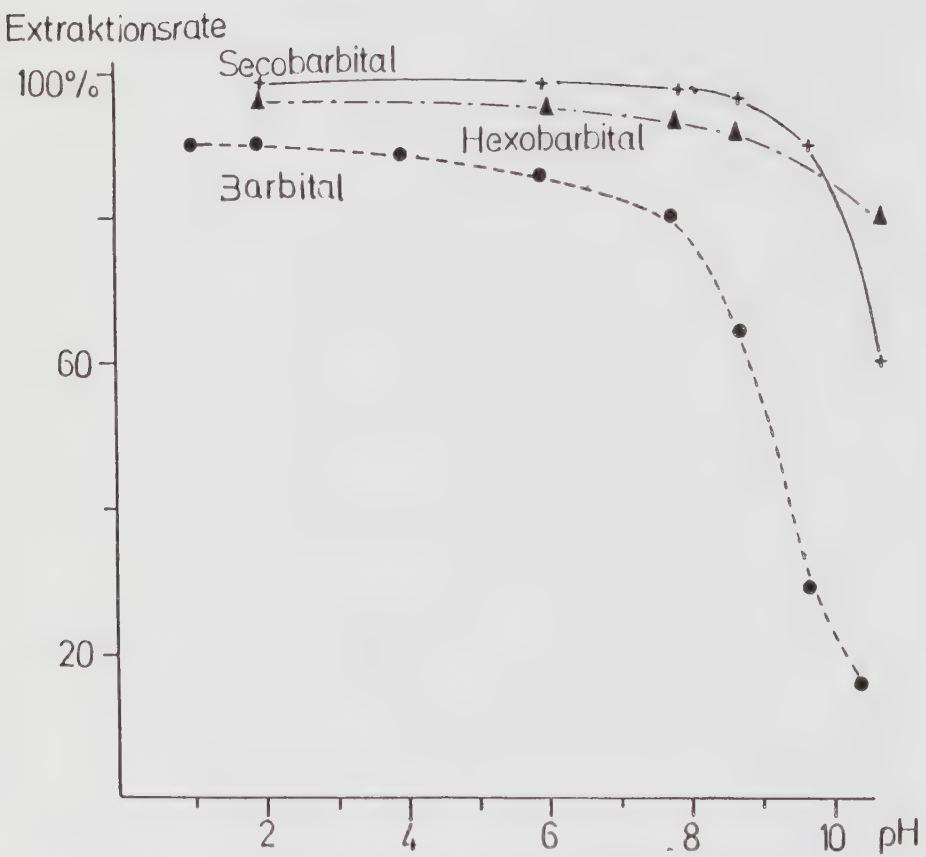


Abb. 7: Abhängigkeit der Barbituratextraktionsrate vom pH - Wert des Milieus (15)

4.4. Gewebsuntersuchungen von Leber und Lunge

4.4.1. Bedeutung von Leber und Lunge für die Analyse

Leber: In der Leber als Hauptentgiftungsorgan im menschlichen Körper sind zahlreiche Arzneimittel in höherer Konzentration nachweisbar als im Blut (89). Als einer der ersten befaßte sich schon 1955 WRIGHT (26) mit dem Verhältnis der Konzentrationen zwischen Leber und Blut und stellte die These auf, daß bei Eintritt des Todes kurz nach Einnahme des Agens die Leberkonzentration signifikant höher sei. CURRY (26) präzisierte 1960 nach Untersuchung von 52 Barbituratodesfällen (Phenobarbital und Barbital als Substanzen ausgeschlossen wegen der Akkumulationstendenz) dahingehend, daß bei einem Quotienten Leber : Blut größer als 4 der Tod innerhalb 5 Stunden nach Einnahme der tödlichen Barbituratdosis eingetreten ist (Ausnahmen liegen vor bei Blutspiegeln, die kleiner als 40 mg/l sind). STAJIC et al. (89) untersuchten 12 Todesfälle mit Barbituratbeteiligung. Bei fünf von ihnen, die akut verstarben, streuten die Leber : Blut-Werte zwischen 1,6 (Pentobarbital) und 4,9 (Phenobarbital). Die Blutspiegel lagen in keinem Fall über 30 mg/l (bestimmt über XAD-Elution). Sie machten auch die Feststellung, daß die Quotienten bei Phenobarbital niedriger sind als bei anderen Barbituraten. Bei einer Streubreite von 3,2 - 12, mit Mittel um 5, für Barbiturate allgemein, zeigten Phenobarbitalvergiftungen nur Quotienten von 1,5 - 3,5, bei einem Mittel von 1,8. Sie führten dies auf die geringere Lipidlöslichkeit und damit auch geringere Parenchymanreicherung von Phenobarbital zurück.

Lunge: In den letzten Jahren werden Untersuchungen angestellt über eine ähnliche Rolle der Lunge für Detoxikations- und Konzentrationsvorgänge. Durch ihre zentrale Lage mit Durchfluß des gesamten Herzminutenvolumens und durch ihre große Kapillaroberfläche ist sie zu einer wirkungsvollen Extraktion von Substanzen aus dem Blutfluß fähig.

Während für endogene Substanzen eine aktive Aufnahme in Zellen des Lungenparenchyms nachgewiesen ist, erfolgt diese bei den meisten exogenen durch einfache Diffusion und ist damit abhängig von Molekulargewicht, Fettlöslichkeit und Ionisationsgrad der Substanz. Bisherige Untersuchungen weisen auf eine verstärkte Akkumulation von kationisch geladenen, lipophilen Verbindungen hin (77). OKUMURA et al. (71) beschreiben eine Anreicherung basischer Arzneimittel (vermutlich zurückzuführen auf spezifische Bindungsstellen).

Die Verdrängung einer im Lungengewebe vorhandenen Substanz durch Angebot einer anderen ist in vitro nachgewiesen, ebenso die Metabolisierung verschiedener Verbindungen, wie z. B. Pentobarbital (77).

Durch Akkumulation hauptsächlich solcher Substanzen im Lungenparenchym, die dort auch metabolisiert werden können (77) und durch den Nachweis unterschiedlicher Enzymmuster in Lunge und Leber (64) sind Konzentrationsunterschiede zwischen beiden Geweben zu erwarten. Die Untersuchung von Lungenproben bei Hinweis auf bestimmte Arzneimittelvergiftung kann damit, vor allem im Bereich niedriger Blutmedikamentenspiegel, diagnostisch wichtig werden.

4.4.2. Methoden der Gewebsextraktion

Nach Injektion oder direkter Aufnahme aus dem Magen-Darmtrakt erfolgt der Transport von Substanzen im Blut zum Teil in freier Form, zum Teil gebunden an Proteine. Die Speicherung im Gewebe kommt zustande durch Austritt der freien Substanz aus der Blutbahn und ihre Bindung an Gewebsproteine. Zur vollständigen Extraktion von Arzneimitteln muß also die Gewebeprobe mechanisch aufgeschlossen und in einem weiteren Schritt die Proteinbindung gelöst werden.

Manche Autoren wenden Verfahren zur Lösung der Proteinbindung auch bei Bearbeitung von Serum- und Blutproben an, jedoch ist hier die Steigerung der Extraktionsausbeuten geringer als bei Gewebeproben, da die Substanzen nur zum Teil in gebundenem Zustand vorliegen. THOMA et al. (97) machen bei Untersuchung von Serumproben auf Antiepileptika die Beobachtung, daß die teilweise Proteinfällung mit Ammoniumsulfat keinen Einfluß auf die Extraktionsausbeute hat, jedoch durch Bindung von u. a. Fettsäuren das Auftreten von Störsubstanzen im Chromatogramm vermindert.

Die Mehrzahl deproteinisierender Methoden werden im Zusammenhang mit der Bearbeitung von Gewebeproben entwickelt:

Beim klassischen STAS-OTTO-Verfahren werden 500 g homogenisierte Organteile in weinsaurem Aceton oder Alkohol gefällt, das Filtrat im Rotationsverdampfer eingedampft, der Rückstand in Wasser aufgenommen und nach erneuter Filtration mit Ether extrahiert (59).

Ein anderes Aufarbeitungsverfahren entwickelt VALOV in den 40er Jahren: Er verdünnt 60 ml Blut oder homogenisiertes Organmaterial mit Wasser und versetzt diese Aufschwemmung nacheinander mit Natronlauge, Natriumwolframatlösung und Schwefelsäure. Das saure Filtrat wird mit etwa 450 ml Ethylether extrahiert (81). Jedoch erkaufte man sich den Vorteil der sehr sauberen Extraktionsrückstände mit einem 50 %igen Ausbeuteverlust (34).

In neueren Arbeiten wird die Methode der Deproteinisierung verbunden mit einer Elution über XAD - 2 Harz:

IBRAHIM et al. (42) variieren zur Bearbeitung von Organproben die STAS-OTTO-Methode. Sie homogenisieren 500 g Gewebe zusammen mit 500 ml Wasser, säuern das Gemisch mit 3 ml gesättigter Weinsteinsäure an und unterziehen es der Dampfdestillation.

Der Destillationsrückstand wird filtriert und auf etwa 100 ml eingedampft. Die Zugabe von 95 %igem Alkohol zum Konzentrat im Verhältnis 6:1 bewirkt eine Eiweißfällung. Nach erneuter Filtration und Eindampfung wird der Rückstand in 100 ml heißem Wasser aufgenommen. Die Probe wird mit konzentriertem Ammoniumhydroxid auf einen pH-Wert von 8,5 - 9 eingestellt und auf XAD - 2 Harz gegeben. Die Elution erfolgt mit Chloroform/Isopropanol 3:1. Die Ergebnisse ihrer Versuche sind u. a.: Zur Extraktion von 500 g Gewebe genügen 2 g XAD - 2 Harz und die Wiederfindungsrate ihrer Methode mit XAD-Harz ist ebenso hoch wie in der STAS-OTTO-Methode (69 %), die eine flüssig - flüssig Extraktion und Dampfdestillation beinhaltet. Ebenfalls Säurehydrolyse mit anschließender Erhitzung der homogenisierten Organprobe verwenden PRANITIS et al. (78), sie verzichten dabei jedoch auf zusätzliche deproteinisierende Maßnahmen. In einem Screeningverfahren isolieren sie Arzneimittel durch Homogenisieren von 20 g Gewebe (verdünnt mit 100 ml Wasser), und nachfolgender Dampfbaderhitzung der mit 2 ml konzentrierter Salzsäure versetzten Probe. Das Gemisch wird mit Natronlauge bis pH 7,5 - 8 alkalisiert und über XAD-Harz mit 50 ml Ethylacetat eluiert. Im Gewebe erreichen sie für Phenobarbital eine Wiederfindungsrate von 58,6 % (bestimmt über UV-Photometrie). Mitunter sind jedoch vor der Analyse noch weitere Säuberungen des Eluats nötig (weitere Extraktionen bei saurem und basischem pH mit Chloroform).

Alternativ zu den bisher beschriebenen Methoden der Proteinfällung oder Säurehydrolyse bietet sich ein schonenderes Verfahren an, die enzymatische Hydrolyse mit Proteasen:

V. MEYER et al. (65) füllen 4 ml Blut mit 24 ml Tris-base pH 10,5 auf und fügen dem Gemisch 4 mg Subtilisin bei.

Nach halbstündigem Erhitzen wird die Lösung mit 2 g XAD - 2 Harz geschüttelt und in ein leeres XAD-Säulchen gegeben. Als Elutionsmittel verwenden sie Ether/Ethylacetat 1:1. Die Wiederfindungsrate von Aprobarbital steigt mit Subtilisinbehandlung von 70 auf 100 %. Die Methode zeigt sich im Vergleich der Säurehydrolyse und der Wolframateinweißfällung überlegen. Der Effekt von Subtilisin ist nach Meinung der Autoren jedoch nicht in der Freisetzung von Arzneimitteln aus der Proteinbindung zu sehen, sondern in der Verflüssigung der Probe (bzw. des Gewebshomogenats) und einer damit besseren Benetzbarkeit (physikalischer Effekt).

Bei der Untersuchung einer tödlichen Barbitalextoxikation vergleichen HOLZBECHER et al. (41) die Ergebnisse von verschiedenen Methoden der Gewebsextraktion, die sie am gleichen Probenmaterial anwenden. Sie homogenisieren 5 g Gewebe zusammen mit 25 ml Trispuffer pH 10,5, ergänzen die Aufschwemmung mit Wasser bis zu einem Endvolumen von 50 ml und verwenden jeweils 2 ml dieser Lösung zur Analyse. Die Quantifizierung erfolgt in allen Fällen mit Hilfe der UV-Photometrie. Sie erhalten folgende Barbitalkonzentrationen der Leber: nach

- direkter Gewebsextraktion	595 mg/l
- zusätzlicher Zugabe von internem Standard	590 mg/l
- Säurehydrolyse mit Erhitzung	530 mg/l
- Subtilisinhydrolyse	565 mg/l

Es finden sich sowohl bei direkter Extraktion als auch nach Proteinaufschluß des Gewebes vergleichbare Ergebnisse. Die Untersucher folgern daraus, daß in hohen Konzentrationsbereichen die Extraktion aus Gewebe auch ohne Aufschluß befriedigend erfolgen kann.

4.4.3. Verluste bei Gewebsextraktion

Die Schwierigkeiten des Barbituratnachweises aus Gewebe zeigt sich schon aus einer Zusammenstellung von STAJIC et al. (89), in der die Wiederfindungsraten für Pentobarbital aus Lebergewebe bei verschiedenen Methoden zwischen 19 - 107 % schwanken (über Photometrie bestimmt). Die Autoren kommen in einer eigenen Untersuchung über Verluste bei der Analyse von Lebergewebe mit der XAD-Methode zu folgenden Ergebnissen:

Von 100 µg Pentobarbital gehen nach Hydrolyse, Zentrifugation und Filtration des Homogenats durch Gewebeseinschluß 53 µg verloren, weitere Verluste von 22 µg treten während der folgenden Analyse auf, so daß sich für Pentobarbital eine Wiederfindung von 32 % ergibt. Nur geringe Mengen von 0 - 5 % werden während des Durchflusses der Probe durch die Säule nicht am Harz adsorbiert.

Im stark alkalischen Bereich (1-n Natronlauge) verschiebt sich bei 5,5'-substituierten Barbituraten das Absorptionsmaximum bis 255 nm mit einem Minimum bei 235 nm (bathochromer Effekt). Demgegenüber zeigen N-methylierte Barbiturate nur eine geringe Maximumverschiebung bis 245 nm (geringere Enolisierbarkeit) (82).

Nach GOLDBAUM (37) ist das Vorliegen eines 5,5'-substituierten Barbiturates nur dann anzunehmen, wenn die größte positive Differenz der optischen Dichten, gemessen bei pH 10 und 13, bei 260 nm erscheint, abnimmt bis zu einer negativen Differenz bei 250 nm und eine maximal negative Differenz bei 240 nm aufweist. Die Differenz bei 260 nm ist dann direkt proportional der Barbituratkonzentration. Die Extinktionsdifferenz bei 305 nm gibt einen Hinweis, daß die Differenz bei 260 nm nicht allein auf Barbiturate zurückzuführen ist und sollte bei dieser Wellenlänge möglichst klein sein.

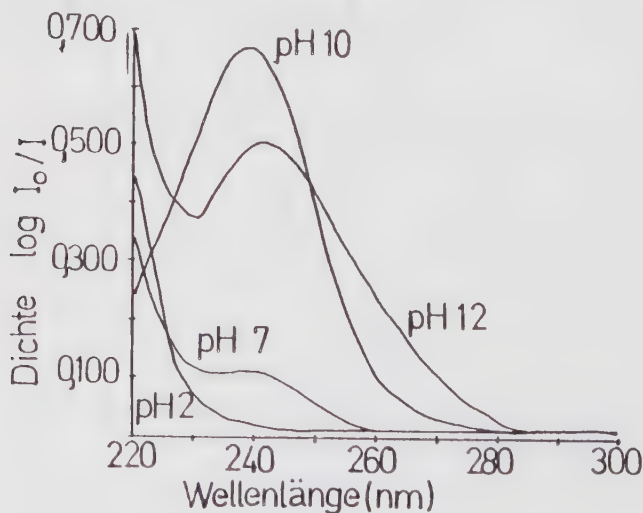


Abb. 9: UV-Absorptionsspektren von Barbital in wässrigen Lösungen mit verschiedenem pH (82)

4.5.2. Methoden der quantitativen und qualitativen Bestimmung

1952 beschreibt GOLDBAUM (37) eine Methode zur quantitativen und qualitativen Bestimmung von Barbituraten in biologischem Material. Er schüttelt 1 - 5 ml Blut mit 50 ml Chloroform aus (bei größeren Probenmengen entsprechend mehr Lösungsmittel). Nach dem Abtrennen und Filtrieren wird ein aliquoter Anteil des Chloroform mit 4 ml 0,45 n Natronlauge extrahiert. 3 ml der alkalischen Lösung gelangen zur Messung gegen eine Leerprobe, die auf gleiche Weise wie das Blut behandelt wurde. Die Extinktion der alkalischen Lösung wird bei 260 nm bestimmt, 2 ml des alkalischen Extrakts mit 1 ml 1 m Borat - Kaliumchloridpuffer auf einen pH - Wert zwischen 10,2 und 10,6 eingestellt und die Extinktion erneut gemessen.

Er erhält so Differenzen, die charakteristisch sind für alle nicht N - methylierten oder Thiobarbiturate. Durch Vergleich der Differenzen bei verschiedenen Wellenlängen mit der Differenz bei 260 nm bekommt er Quotienten, mit deren Hilfe er unter sechs der häufig gebrauchten Barbiturate unterscheiden kann. Jedoch bestehen Verwechslungsmöglichkeiten mit Barbitursäurederivaten, die ähnliche Seitenketten wie die identifizierten haben. Die Nachweisgrenzen liegen bei 1 mg/l Blut und 3 mg/kg Gewebe.

Eine Identifizierung von Thiopental gelingt NOVAKOVA et al. (70). Im Vergleich mit einer Testsubstanz zeigt die von ihnen untersuchte Substanz gleiches Spektralverhalten bei neutralem und basischem pH und ein konstantes Verhältnis beider Hauptmaxima (gleiche Verschiebung bei Alkalisierung der Probe).

GOLDBAUMS Methode wird 1956 von BROUGHTON (20) in modifizierter Weise zur Analyse eingesetzt. 5 ml Blut oder Harn werden mit Puffergemisch auf pH 7 eingestellt und mit 90 ml Chloroform extrahiert. Der Extrakt wird zur Reinigung zweimal mit Puffer pH 7,4

gewaschen und anschließend filtriert. Die Barbiturate werden mit 5 ml 0,45 n Natronlauge reextrahiert. Zu jeweils 2 ml des alkalischen Extraktes werden

a) 2 ml 0,45 n Natronlauge

b) 2 ml 0,6 m Borsäure-Kaliumchloridlösung zugemischt.

Diese beiden Lösungen werden im Wellenlängenbereich 265 - 227 nm photometriert. Zur Identifizierung der Barbituratgruppe wird ein neuer alkalischer Extrakt 15 min erhitzt, wieder abgekühlt und wie oben bearbeitet. Die Differenz zwischen erster und zweiter Messung entspricht der Abnahme der Barbituratkonzentration infolge Hydrolyse. BROUGHTON unterscheidet mit seiner Methode zwischen den kurz-, mittel- und langwirksamen Barbituraten. Seine Nachweisgrenze liegt bei 8 mg/l Blut.

Extraktion über Kieselguhr (Extrelut^R-Säule):

Die von BREITER (16) modifizierte BROUGHTON-Methode erlaubt die quantitative und qualitative Bestimmung von sowohl 5,5'-substituierten als auch von 1,5,5'-substituierten Barbituraten (wie z. B. Hexobarbital). Er ergänzt 5 ml homogenisiertes Blut durch Zugabe von 0,066 m Phosphatpuffer pH 7,4 auf eine Gesamtprobenmenge von 20 ml, gibt diese auf eine Extrelut^R-Säule und eluiert mit 50 ml Diethylether oder 60 ml Chloroform. Das Eluat reextrahiert er mit 3 ml 0,5 m Natronlauge. Er stellt zwei Lösungen her mit

a) pH 13,4 (durch Zugabe von 0,5 m Natronlauge)

b) pH 10,1 (Zugabe von 0,6 m Boratpuffer).

Referenzprobe ist eine Küvette mit destilliertem Wasser. Ein externer Standard mit 25 mg/l Barbital wird auf gleiche Weise aufgearbeitet.

Die Berechnung der Konzentration 5,5'-substituierter Barbiturate erfolgt über die Differenz ihrer optischen Dichte bei 260 nm. Zur Berechnung 1,5,5'-substituierter Barbiturate wird die Differenz der Proben bei den pH-Werten 13,4 und 1 herangezogen (240 nm). Nicht angewandt werden kann das Verfahren auf Thiobarbiturate und Methohexital.

4.5.3. Photometrisch interferierende Substanzen

COOPER et al. (25) fanden bei der Konzentrationsbestimmung von Phenobarbital starke Differenzen zwischen photometrischen und gaschromatographischen Ergebnissen, wenn Diphenylhydantoin in der Probe anwesend war. Daneben fanden sie falsch positive Resultate bei Vorliegen von Salizylaten, Bemegrid, Sulfonamiden und Carbromal. KANANEN et al. (46) isolierten Dilantin als Störsubstanz bei der Phenobarbitalbestimmung und JACKSON et al. (45) fanden in postmortalem Material sieben phenolische Verbindungen mit barbituratähnlichem Absorptionsverhalten, sogenannte Pseudobarbiturate. Sie verweisen auf die Wichtigkeit, das ganze UV-Spektrum von 230 - 330 nm aufzuzeichnen, um solche Fehler besser erkennen zu können. Dennoch lassen sich laut BÜCH et al. (21) z. B. Sulfonamide, mit ihren für Barbiturate typischen UV-Spektren und gleichen pH-abhängigen Maxima, auch damit nicht ausschließen. Bei verfaulten Blut- und Gewebeproben halten CHRISTOPOULOS et al. (23) die üblichen Extraktionsverfahren für ungenügend, um aussagekräftige UV-Spektren zu erhalten. Sie geben folgende Methode zur Reinigung verwesenen Materials an:

10 ml (10 g) Probe werden mit 0,5 ml konzentrierter Salzsäure versetzt und zur Abtrennung der Störsubstanzen der Wasserdampfdestillation unterzogen. Etwa 200 ml Destillat werden verworfen und der Sumpf nach BROUGHTON (1956) aufgearbeitet. Die Wiederfindungsraten reichen von 88 - 96 %.

4.5.4. Beurteilung der Photometrie

Identifikation über Absorptionsspektren:

Die Photometrie wird heute hauptsächlich eingesetzt, um über andere Nachweismethoden gewonnene quantitative Ergebnisse zu bestätigen. Qualitativ lassen sich mit ihrer Hilfe besonders einfach Thiobarbiturate durch ihre charakteristischen Maxima im Alkalischen von den anderen Barbituraten abgrenzen. Dies kann von Nutzen werden, wenn ein Verdacht auf eine bestimmte Barbituratintoxikation überprüft werden soll. Bei Intoxikation mit einem unbekannten Barbiturat ist dessen Einordnung in eine Gruppe (lang - mittellang - kurz wirksam) nicht befriedigend, da sich selbst Barbiturate innerhalb der Gruppen stark in ihren Wirkungsstärken und -dauern unterscheiden. Eine Differenzierung von Barbituraten innerhalb einer Gruppe, wie es z.B. GOLDBAUM (37) beschreibt, ist wegen der sehr ähnlichen Spektren nicht mit Sicherheit möglich. Ohne genaue Analyse ist auch keine spezifische Konzentrationsbestimmung möglich.

Quantifizierung:

Die quantitative Auswertung von UV - Spektren hat nicht nur die genaue Isolierung des vorliegenden Barbiturates zur Voraussetzung, sondern auch das Fehlen von interferierenden Substanzen, die die Auswertung des Kurvenverlaufs erschweren oder falsch positive Resultate ergeben. Die photometrisch störende Salizylsäure kann ausgeschlossen werden, wenn über Extrelut^R extrahiert wird, das durch seine leicht alkalische Oberfläche starke Säuren zurückhält (15). Dicumarol, Dilantin und Sulfadiazin besitzen bei pH 13 und 10,5 dieselbe Absorption und wirken dadurch nicht störend (37).

Eine weitere Einschränkung erfährt die Interpretation von Spektren bei Vorliegen von Barbituratgemischen, da das Mengenverhältnis der einzelnen Barbiturate

zueinander nicht bekannt ist. Das Vorliegen von Barbituraten mit verschiedenem Absorptionsverhalten stört zudem den Kurvenverlauf, der nicht verwertbar ist.

Grenzen sind auch gesetzt durch die Empfindlichkeit des Verfahrens. Bei Einsatz von 1 ml Plasma findet STREET (92) die Photometrie nicht geeignet zum Nachweis therapeutischer Blutspiegel. KANANEN et al. (46) erreichen eine Nachweisgrenze von 3 mg/l Blut, GOLDBAUM (37) weist Blutspiegel bis 1 mg/l und Gewebesspiegel bis 3 mg/l nach. Unter verbesserten Extraktionsbedingungen mit Extrelut^R wird als Grenze 2 mg/l Probe genannt (15).

4.6. Gaschromatographie

Die Identifikation und quantitative Bestimmung von Arzneimitteln wird von vielen Autoren gaschromatographisch durchgeführt. Die ersten gaschromatographischen Verfahren zur Barbituratbestimmung sind mit den Namen BROCHMANN - HANSSEN und SVENDSEN (17) und JANAK (50) verknüpft (um 1960).

In den folgenden Jahren werden zahlreiche Versuche unternommen, das Aufarbeitungsverfahren der Proben zu verbessern und eine möglichst vollständige Entfernung von störenden Begleitverunreinigungen zu erreichen. Eine weitere Schwierigkeit bei der Barbituratbestimmung stellen die nicht idealen gaschromatographischen Eigenschaften dar: Infolge ihrer polaren Natur zeigen freie Barbitursäuren eine beachtliche Adsorption und folglich starke Bindung an die stationäre Phase der Chromatographiesäule (24). Dies führt zu Säulenverunreinigung, Peakassymetrie, verlängerten Retentionszeiten und Tailing in der Anzeige und erschweren so die exakte Trennung der Peaks und damit die quantitative Analyse (19).

Diese Probleme veranlaßten Forscher, durch Alkylierung Barbitursäurederivate zu bilden, die bei Erhitzung flüchtiger sind und eine geringere Adsorption an die Säule aufweisen (19, 36).

4.6.1. Trennung von Barbitursäuren nach geeigneter Derivatisierung

BROCHMANN - HANSSEN et al. (19) formen 1,3-Dimethylderivate durch Zugabe von Trimethylaniliniumhydroxid (TMAH) zum Extrakt. Sie können 12 Barbiturate auftrennen. Da einige Barbiturate nach Methylierung die gleichen Derivate bilden (Barbital/Metharbital, Phenobarbital/Mephobarbital), müssen diese unterschieden werden durch Analyse der Probe vor und nach Derivatisierung.

MARTIN et al. (63) bilden ebenfalls 1,3-Dimethylderivate. Sie geben zum Eindampfungsrückstand (des ersten Extraktes) Dimethylsulfat als alkylierendes Agens. Der Gesamtzeitbedarf für eine Analyse liegt bei 45 min. Jedoch werden zwei der vier untersuchten Barbiturate nicht getrennt. Über Wiederfindungsraten wird nicht berichtet. SINE et al. (85) halten den ungeeigneten internen Standard (Methylpalmitat) verantwortlich für die nicht linearen Beziehungen zwischen Barbiturat und Standard bei verschiedenen Konzentrationen.

STEVENSON (90) verbessert und vereinfacht die vorbeschriebene Methode durch Methylierung auf den Trennsäulen. Er setzt Tetramethylammoniumhydroxid (TMH) zur Derivatisierung ein. Bei der Chromatographie von 5-Phenylbarbitursäure findet er zwei Peaks und vermutet eine alkalische Zersetzung der Probe.

SKINNER et al. (86) modifizieren die Methode nach BROCHMANN - HANSEN, indem sie TMAH sowohl zur Extraktion wie auch zur Methylierung einsetzen. Mit dieser schnellen Variante weisen sie Serumbarbituratspiegel von 2 - 100 mg/l nach.

STREET (92) empfiehlt die gaschromatographische Untersuchung von nicht-derivatisierten Barbituraten zur quantitativen Analyse mit anschließender Derivatisierung zur qualitativen Bestimmung. Nach seinen Ergebnissen erlaubt selbst die Verwendung mehrerer gaschromatographischer Säulen nicht die sichere Identifizierung underivatisierter Barbiturate. Er bildet daher auf der Säule Trimethylsilylderivate durch Reaktion mit N,O-Bis(trimethylsilyl)acetamid (BSA) und vergleicht die Retentionszeiten der Derivate mit einer analog behandelten Barbituratprobe. Als weitere Bestätigung der Identität eines Barbiturates kann auch die Derivatisierung nach BROCHMANN - HANSEN (19) angewandt werden.

Bei mehreren von ihm ausprobierten Derivatisierungsmethoden findet er das Auftreten zusätzlicher Peaks, inkonstante relative Peakhöhen und unterschiedliche Wiederfindungsraten, so daß er sie ungeeignet hält zur quantitativen Analyse. Reproduzierbare quantitative Ergebnisse erhält er bei der Chromatographie nicht-derivatisierter Barbiturate im Bereich 1 - 10 mg/l. Für Phenobarbital ist die Wiederfindungsrate 95 - 105 % (Bereich 4 - 20 mg/l).

Weitere Autoren, die eine Derivatisierung von Barbituraten durchführen, sind MACGEE (58) mit Tetraethylammoniumhydroxid (TEH 40), KANANEN et al. (46) und MALKUS et al. (61) mit jeweils TMAH und FIERECK et al. (31) mit Dimethylsulfat.

4.6.2. Trennung von Barbitursäuren ohne Derivatisierung

Die Literatur bietet eine Vielzahl von Verfahren, um Barbiturate aus biologischem Material zu isolieren und underivatisiert gaschromatographisch zu bestimmen. Oft werden Barbiturate in einem erweiterten Screeningprogramm zusammen mit anderen Substanzen erfaßt, wie z.B. beim Nachweis von Drogen (8), Tranquillizern (48) oder in Kombination mit der Analyse auf Gluthetimid (85) und Diphenylhydantoin (25). Im folgenden wird eine Auswahl von Autoren genannt, die ihre Extraktionsmethode speziell auf den Nachweis von Barbituraten ausgerichtet haben.

SUNSHINE et al. (95) unterscheiden sieben Barbiturate und erhalten auf einer SE - 30 Säule gut getrennte Peaks. Durch Integration der Peakflächen errechnen sie die Konzentration der vorliegenden Barbiturate und erhalten noch bei einem Blutspiegel von 1 mg/l eine Wiederfindung von 85 - 90 %. Ein starkes Tailing des Phenobarbitalpeaks verhindert jedoch dessen quantitative Bestimmung, so daß eine Erhöhung der Ofentemperatur nötig wird. Ebenso werden alle kurz-wirksamen Barbiturate bei dieser Temperatur nicht getrennt.

LEACH et al. (56) verbessern die chromatographische Trennung der Barbiturate durch Änderungen im chromatographischen System. Sie konditionieren das Trägermaterial, um eine leichtere Desorption der Substanzen zu erhalten und setzen eine dicht gepackte Säule ein, die auf Kosten der Analysenzeit eine gute Trennleistung bietet. Sie trennen 15 Barbiturate bei nur leichtem Tailing der Peaks.

Ebenfalls durch eine Verbesserung der gaschromatographischen Bedingungen versucht KÜLPMANN (50) eine Derivatbildung der Barbiturate zu vermeiden. Er verwendet silanisierte Glassäulen und besonders inertes Trägermaterial. Zur quantitativen Aufarbeitung einer

Probe benötigt er 2 Stunden.. Er trennt 19 Barbiturate erfolgreich auf. Die Wiederfindungsraten liegen bei 91 - 108 %.

BREIMER et al. (13) entwickeln ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Hexobarbital. Zur Erhöhung der Empfindlichkeit der Methode verwenden sie einen stickstoffempfindlichen Detektor (N - FID) und erreichen damit eine horizontale Basislinie, weniger Interferenzen und einen kleinen Flüssigkeitspeak.

Die Trennung der Peaks ist problemlos, das Tailing nur gering. Die Nachweisgrenze liegt bei therapeutischen Plasmaspiegeln (bis zu 50 ug/l). Die Wiederfindung beträgt im Bereich 0,1 - 60 mg/l 65 %.

4.6.3. Vor- und Nachteile der Chromatographie derivatisierter Barbiturate

Der Versuch, durch Derivatbildung der Barbiturate die polaren Gruppen zu maskieren und so die Adsorption und Zersetzung an der stationären Phase zu vermindern, weist Nachteile auf, die viele Forscher veranlassen, Barbiturate direkt, ohne einen Alkylierungsvorgang gaschromatographisch nachzuweisen.

Das von vielen Autoren empfohlene Methylierungsverfahren (ebenso wie Butylierung und Hexylierung) beansprucht einen zusätzlichen Arbeitsschritt und damit mehr Zeit. Als weitere Nachteile dieses Verfahrens werden genannt (50): Die Entstehung uneinheitlicher Produkte und die Stabilisierung von Begleitverunreinigungen. Während KÜLPMANN (50) eine kürzere Lebensdauer der stationären Phasen nach Auftragen alkylierter Produkte beschreibt, bedarf es nach KANANEN et al. (46) nach direkter Extraktion wesentlich öfters der Säulenkonditionierung und Detektorreinigung.

Barbiturate mit einer Methylgruppe in Position 1 können nach Methylierung nicht mehr getrennt werden von solchen ohne N-Substituent, da beide dieselben Dimethyl-derivate bilden. Dieser Informationsverlust trifft zu für die Paare Amobarbital/Pentobarbital und Phenobarbital/Me-phobarbital (19, 63). Da letzteres zu Phenobarbital metabolisiert wird, ist diesem Problem jedoch keine große klinische Bedeutung beizumessen. Wichtiger ist die Zersetzung der Probe nach längerem Stehenlassen, die zu einer Abnahme der gemessenen Barbituratkonzentration und zum Auftreten zusätzlicher Peaks führt. Verantwortlich ist die alkalische Reaktion des alkylierenden Agens, die eine Hydrolyse des Barbitursäurerings zur Folge hat (6, 19, 46).

Bei Methylierung auf den Trennsäulen treten zu jedem Barbiturat zwei Peaks auf, bedingt durch unvollständige Alkylierung (19).

4.6.4. Variationen gaschromatographischer Bedingungen

Trägermaterial:

Als Träger der stationären Phase kommen eine Reihe von Substanzen in Frage (Chromosorb, Celite, Firebrick etc.). Bei allen diesen Stoffen kann eine Adsorption stören, die sich auf polare Substanzen wie Barbiturate durch das Trägermaterial auswirkt. Diese adsorptiven Effekte sind bedingt durch schwache van-der-Waalsche Kräfte und starke Hydrogenbindungen (36).

WILLIAMS et al. (101) verringern die Adsorptionskräfte durch Deaktivierung der freien Hydroxylgruppen des Trägermaterials mittels Silanisierung, anschließendem Trocknen und Einbringen in Toluol.

STREET (92) behandelt das Trägermaterial mit einem Hitzeabbauprodukt eines Silicongummis (Methyphenylsilicon) bei einer Temperatur von 400 °C (im Vakuum).

Symmetrische Peaks erhält CIEPLINSKI (24), indem er das silanisierte Trägermaterial zusätzlich mit bestimmten Säuren, die in ihrer Azidität dem sauren Charakter des Untersuchungsgutes entsprechen, in Kontakt bringt.

MARIGO et al. (62) stellen eine interessante Reduktion der Barbituratadsorption fest nach Vorkonditionierung der Säule mit Tetraethylorthosilicat. Gleichzeitig nimmt auch die Variabilität der Retentionszeiten ab und die Sensitivität des Systems zu.

Weitere Autoren, die die Methode der Silanisierung verwenden, sind BROCHMANN - HANSEN et al. (17). Sie waschen Chromosorb W mit Salzsäure und methanolischem Kaliumhydroxid und behandeln es darauf mit Hexamethyldisilazan.

SINE et al. (85) und LEACH et al. (56) waschen Chromosorb W mit Säure und behandeln anschließend mit Dimethyldichlorsilan.

Stationäre Phase:

Nach BROCHMANN - HANSSEN (18) kann man davon ausgehen, daß eine polare Flüssigkeit dazu tendiert, freie Adsorptionsstellen auf der stationären Phase zu besetzen und deren Adsorption so zu verringern. Andererseits kommen mit Zunahme der Polarität der stationären Phase Interaktionen ins Spiel, die die Säule für kleine Strukturunterschiede in den polaren Gruppen der Probe empfindlicher machen und so eine bessere Trennung gewährleisten (18). Die verschiedene Bewertung dieser Vor- und Nachteile kommt in den zahlreichen Versuchen zum Ausdruck, die unternommen werden, um eine zur Barbituratbestimmung ideale stationäre Phase zu finden.

BERRY et al. (8) untersuchen 12 verschiedene stationäre Phasen, um eine einzige Säule zu isolieren, die eine verlässliche, genaue und spezifische Identifikation von Barbituraten im therapeutischen und toxischen Konzentrationsbereich liefert. Sie finden die Phase 4 % CDMS am geeignetsten, empfehlen aber eine zweite Säule (4 % OV 225) zur Absicherung der qualitativen Funde.

Aufgrund der weitverbreiteten Anwendung (24, 47, 72, 73, 85) und damit großen Anzahl von bereits vorliegenden Daten wählen GILL et al. (36) die apolare stationäre Phase SE - 30 zur Barbituratanalyse. Die von dieser Säule nicht getrennten Barbiturate Pentobarbital/Amobarbital und Hexobarbital/Thiobarbital können auf Apiezon L unterschieden werden, die für BROCHMANN - HANSSEN (18) die Flüssigkeit der Wahl ist zur Trennung von Barbituraten.

MACHATA et al. (59) testen Carbowax 20 M und finden diese Phase geeignet zur Trennung von Substanzen mit besonders großer Polarität wie z. B. Phenobarbital und Cyclobarbital.

Von anderen Autoren wird über eine adäquate Trennung von Barbituraten auf OV 101 berichtet (23, 80), ebenso eignet sich die Phase 3 % OV 17 zur Chromatographie saurer und neutraler Arzneimittel (13, 48, 53, 66).

GELBKE et al. (35) und COOPER et al. (25) verwenden die letztgenannte Phase in Verbindung mit OV 101. Bei Benutzung nur einer Phase geben jedoch COOPER et al. (25) OV 17 als der selektiveren den Vorzug. MACGEE (58) bevorzugt die dicht gepackte Säule von OV 101, die bei längerem Gebrauch weniger an Trennschärfe verliert. Auch LEACH et al. (56) nehmen die etwas längeren Retentionszeiten bei dicht gepackten Säulen in Kauf für eine bessere Trennleistung.

Grob zusammengefaßte Anforderungen an eine Säule bestehen in

- einer hohen Selektivität für die zu trennenden Substanzen
- möglichst kurzer Analysenzeit
- einer hohen Halt- und Belastbarkeit ohne nachlassende Wirksamkeit.

Temperatur:

Da hohe Temperaturen zur Zersetzung einiger Substanzen, niedrigere aber zum Tailing in der Anzeige führen (59), ist ein Kompromiß in der Arbeitstemperatur des Gaschromatographen nötig. Nach Untersuchungen von PARKER et al. (72, 73) führen höhere Temperaturen weiterhin bei vielen Barbituraten zu schärferen Peaks, dies jedoch auf Kosten der Trennung. Bei Temperatursteigerung von 190° auf 270°C nimmt die Variabilität der Retentionszeiten ab. Die Mehrzahl der Autoren verwenden Arbeitstemperaturen um 200°C

Detektor:

1974 beschreiben BRCIMER et al. (13) eine Methode zur Bestimmung von Hexobarbital unter Benutzung eines stickstoffempfindlichen Detektors (N - FID). Als Ergebnis erhalten sie eine große Zunahme der Empfindlichkeit ihres Systems. Barbiturate enthalten zwei Stickstoffatome, und da der Detektorausschlag proportional dem Stickstoffäquivalent im Molekül ist, verspricht die Anwesenheit zweier Atome große Sensitivität (13).

Ein weiterer Vorteil eines spezifischen Stickstoffdetektors, wie ihn auch STREET et al. (93) zum Nachweis nicht-derivatisierter Barbiturate einsetzen, ist die im Vergleich zum unspezifischen Nachweisverfahren geringere Interferenz von Verunreinigungen und damit Einsparung von zeitraubender weiterer Reinigung des Extraktes (93).

BREIMER et al. (13) erreichen Nachweisgrenzen für Hexobarbital und Methohexital von 50 ug/l.

4.6.5. Methoden der quantitativen Bestimmung

In der Literatur sind verschiedene Wege der quantitativen Bestimmung von Arzneimittelspiegeln beschritten. Einige Autoren nutzen die Radioaktivität einer der Probe zugefügten markierten Substanz zur Berechnung der Ausbeute (5, 50, 51, 60). Andere führen Parallelproben mit, die einen Standard in einem der Probe ähnlichen Milieu enthält (35, 66). Eine weitere Methode ist die Bestimmung eines Korrekturfaktors, der spezifisch ist für Untersuchungsang und Substanz und die Verluste während der Extraktion korrigiert. Daneben ist recht häufig die Zugabe einer bestimmten Menge einer Substanz zur Probe, die im Analysenergebnis erscheint, so daß dieses entsprechend berichtigt werden kann. Neben der Verwendung von gruppenfremden internen Standards wie Gluthetimid (23) oder Methylpalmitat (63) zur Barbituratquantifizierung werden auch Standardgemische aus mehreren Barbituraten eingesetzt (COOPER et al. (25) drei Barbiturate, MACGEE (58) fünf Barbiturate, SINE et al. (85) sechs Barbiturate). Eine weitere Variationsmöglichkeit liegt im Zeitpunkt der Standardzugabe:

KLEJIN et al. (48) lösen vor der gaschromatographischen Analyse den eingedampften Rückstand in 100 ul Lösungsmittel, das mit Standard versetzt ist.

LEACH et al. (56) verfahren ähnlich, überzeugen sich vor Zugabe des Standards jedoch davon, daß dieser nicht in der Probe vorhanden ist.

MARIGO et al. (62) fügen nach mehreren Extraktionsschritten 1 ug Barbital zur organischen Phase, die sie als nächsten Schritt eindampfen.

4.6.6. Gaschromatographisch interferierende Substanzen

Der Vorteil von Chloroform als Elutionsmittel liegt in der großen Reinheit des Eluats. Dennoch wird eine Reihe von störenden Verbindungen unter neutralen und leicht sauren Bedingungen von Chloroform extrahiert. In der Neutralfraktion finden sich Campher, Meproba-mat, Noludar, Phenacetin, Phenazon, Gluthetimid, Cof-fein, Tybamat, Carbromal, Methaqualon sowie Ester, Kohlenwasserstoffe etc., in der Barbituratfraktion Bemegrid, Methyl-p-hydroxybenzoat, Salizylamid, p-Nitrophenol, Phenylbutazon, ein Chlordiazepoxidmeta-bolit, Diazepam und Oxazepam (56).

Laut NIYOGI et al. (69) gaben bei einer gaschromato-graphischen Routineuntersuchung von verdächtigen und natürlichen Todesfällen etwa 10 % der Ergebnisse falsch positive Resultate. Z. B. besitzt Palmitinsäure diesel-be relative Retentionszeit wie Methohexital oder Ste-arinsäure wie Mephobarbital.

Zur Aufreinigung des Eluats versuchen LEACH et al. (69) die neben den neutralen Verbindungen extrahierten Ba-sen (wie Antihistaminika oder Lokalanästhetika) dadurch zu entfernen, daß sie das Eluat mit Schwefelsäure wa-schen. Wenn die Basen auch nicht vollständig ausgewa-schen werden, so bilden sie doch Salze, die im Tempe-raturbereich 180° - 220°C nicht im Chromatogramm erschei-nen (72). Eine weitgehende Reinigung des Barbituratex-traktes von neutralen Arzneimitteln sowie von Verunrei-nigungen, wie Phtalester und Fettanteilen, gelingt nach SUNSHINE et al. (95) durch Extraktion mit Natronlauge und anschließender Rückextraktion der angesäuerten Lö-sung mit Ethylacetat.

Eluierte Säuren (wie Acetylsalicylsäure) wurden bei der konventionellen flüssig - flüssig Extraktion durch Wa-schen des Eluats mit Phosphatpuffer pH 7,4 entfernt (47).

Für die Extrelut^R-Säule ist sichergestellt, daß diese Substanz selbst bei pH 3 nicht eluiert wird (15).

Das gleiche gilt für endogene Carboxylsäuren, die ebenfalls die gaschromatographische Analyse stören würden. Dagegen wurden in Extrelut^R-Eluaten Harzsäuren wiedergefunden (15). Auch kann Polyethylen, das Material der Extrelut^R-Säulen, nach längerem Gebrauch von organischen Lösungsmitteln angegriffen werden.

Im allgemeinen sind jedoch sowohl Extrelut^R- als auch XAD-Eluate genügend frei von störenden Substanzen, so daß eine Aufreinigung vor der photometrischen und gaschromatographischen Analyse unnötig ist (11, 15, 78).

4.7. Vergleich quantitativer Ergebnisse von Gaschromatographie und Photometrie

Untersuchungen über die Übereinstimmung von gaschromatographischen und photometrischen Ergebnissen erbringen sehr hohe Korrelationskoeffizienten von 0,98 (31) und 0,97 (61). Dabei zeigt sich, daß bei Vorliegen nur eines Barbiturates die Photometrie leicht höhere Werte als die Chromatographie liefert (46, 56, 95). Die Abweichungen liegen bei der Analyse von Barbituratgemischen etwas höher (95).

Die im Durchschnitt höheren Konzentrationen bei der photometrischen Methode lassen sich auf kleine Interferenzen von biologischem Material zurückführen, die jedoch vor der gaschromatographischen Untersuchung entfernt werden, da die dazwischenliegende Extraktion einen weiteren Reinigungsschritt bedeutet (95).

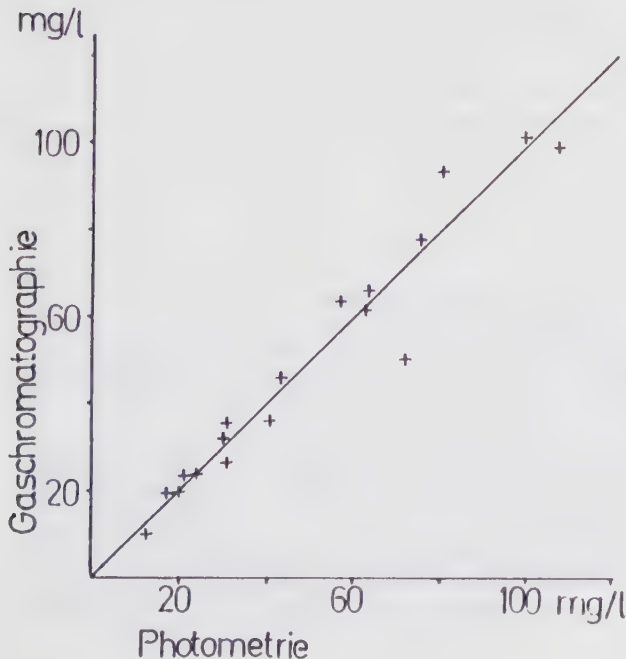


Abb. 10: Vergleich der gaschromatographischen Bestimmung von Phenobarbital mit einer UV-Methode. Korrelationskoeffizient $r = 0,973$ (61).

5. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

5.1. Material

5.1.1. Sektionskollektiv

Untersucht werden Herzblut sowie Gewebeproben aus Leber und Lunge von Sektionsfällen, die in der Zeit von Februar bis Juni 1982 in das Rechtsmedizinische Institut München zur Untersuchung gelangten. In allen Fällen ergaben sich aus den Polizeiakten eindeutige Hinweise auf unnatürlichen Tod durch Barbituratintoxikation. Es werden nur frische Leichen in die Untersuchung aufgenommen, wobei als Auswahlkriterium vor allem noch ungeronnenes Blut und fehlende autolytische Veränderungen der inneren Organe gelten.

5.1.2. Materialgewinnung

Das Blut wird nach Eröffnung des Herzens mit einem Schöpfer aus den Herzhöhlen gewonnen, die Gewebeproben aus Leber und Lunge während der Sektion mit dem Skalpell exziiert. Die überlassenen Proben wiegen jeweils etwa 20 g. Das Blut wird unmittelbar nach der Entnahme in beschriftete Polyethylengefäße gefüllt, die Organteile in Kunststoffolie eingeschweißt und alle Proben bei -20°C gelagert.

5.2. Methode

5.2.1. Aufbereitung des Probenmaterials

Das Blut wird bei Zimmertemperatur aufgetaut und vor der Entnahme eines repräsentativen Anteils kräftig geschüttelt.

Die Organteile werden in gefrorenem Zustand mit einem Messer in dünne Scheiben geschnitten und dann mit dem Skalpell weitmöglichst zerkleinert, um den nachfolgenden Aufschluß des Gewebes mit dem Ultraturrax zu erleichtern. Bei der Bearbeitung der Leber wird darauf geachtet, daß nur Parenchym zur Analyse gelangt.

Gefäßanschnitte und Bindegewebe werden mit der Pinzette entfernt. Ebenso wird mit dem Lungengewebe verfahren, wobei solche Stückchen ausgewählt werden, die makroskopisch nicht zu blutüberfüllt sind.

5.2.2. Herstellung der Analysenproben und Säulenextraktion

Blut: Auf einer Waage werden in einem Becherglas 5 g Blut abgewogen, das durch Zugabe von 15 g destilliertem Wasser unter leichtem Schwenken hämolysiert wird. Mittels einer geeichten 2-ml-Pipette gibt man als internen Standard 1 ml einer 1 g/l-Lösung von Methohexital zu (Endkonzentration in der Probe 200 mg/l), schwenkt noch einmal gut durch und schüttet das Gemisch auf eine Extrelut^R-Säule. Falls das Filterpapier an der Eingußstelle verstopft, wird es mehrmals mit einer Pipettenspitze durchstoßen, damit sich das Blut gleichmäßig auf dem Säulenmaterial verteilen kann.

Als Einwirkdauer werden 15 Minuten vorgegeben. Jeder Versuchsansatz wird jeweils doppelt ausgeführt.

Gewebe: Von dem manuell zerkleinerten Gewebe werden jeweils 5 g Leber bzw. Lunge in Gläser abgewogen. Abweichend von der Methode der Blutbearbeitung fügt man zunächst 5 ml destilliertes Wasser zu jeder Probe. Methohexital wird in gleicher Menge wie den Blutproben beigegeben. Dieser nur geringe Wasserezusatz zum Organmaterial erlaubt eine wesentlich feinere Zerkleinerung mit dem Ultraturrax. Nach der möglichst weitgehenden Homogenisierung des Gewebes werden mit einer geeichten Pipette die restlichen 10 ml destilliertes Wasser zugegeben. Der so erhaltene Organaufschluß wird mit 5 g abgewogenem, gereinigtem XAD - 2 Harz im Zentrifugenglas vermischt und maschinell 2 Minuten gerüttelt. Ein handelsübliches XAD - 2 Säulchen wird geleert, mit einigen Millilitern Methanol ausgewaschen und am Ausfluß mit einem zurechtgeschnittenen Filterplättchen versehen.

Man steckt das Säulchen auf einen Absaugblock und füllt es mit der Gewebe-Harz-Aufschwemmung. Nun wartet man, bis die Flüssigkeit durch das Filterpapier abgetropft ist. Zieht die Lösung nicht spontan ein, schließt man die Wasserstrahlpumpe am Säulenauslauf an. Meist ist es nötig, das Harz mit einer Pipettenspitze etwas aufzulockern, da es durch die organischen Teile leicht verklumpt und die Flüssigkeit dadurch schlecht abzieht. Genügend Trockenheit des Harzes zeigt sich daran, daß es sich durch leichtes Klopfen an die Säulenwand erschüttern läßt.

Anmerkung: XAD - 2 Harzreinigung

Das XAD - 2 Harz wird vor Gebrauch 8 Stunden in einem Soxhlett-Apparat mit Methanol extrahiert und nachfolgend 3 mal mit der doppelten Menge destilliertem Wasser ausgeschüttelt. Nach Absitzenlassen des Harzes wird das freie Wasser abdekantiert. In leicht hydratisiertem Zustand erfolgt die Lagerung in einem geschlossenen Gefäß. Wir verwenden gewaschenes Harz nur einmal. Eine Wiederaufbereitung wäre infolge der Verklumpung durch das organische Material zu schwierig bzw. unmöglich.

5.2.3. Elution

Blut: Die Extrelut^R-Säulen werden am Auslauf mit Kanülen versehen (0,7 x 32 mm), die die Aufgabe haben, den Fluß des Elutionsmittels zu regulieren. Als Auffanggefäße dienen 50-ml-Bechergläser, die eine Beschriftung analog den Extrelut^R-Säulen erhalten.

Gewebe: Da es sich oft nicht vermeiden läßt, daß in den Säulen auch nach dem Absaugen noch Reste von Blut und Wasser zurückgeblieben sind, die bei der anschließenden Elution mitausgeschwemmt würden, wird vor das Auffangglas noch ein Plastikbehälter mit hydrophobem Filter eingeschaltet.

Die Elution erfolgt sowohl bei Blut als auch bei Gewebe mit jeweils 60 ml Chloroform, das in drei Fraktionen zu je 20 ml auf die Säule geschüttet wird.

Die verwendeten Lösungsmittel sind pA-Qualität.

5.2.4. Spektrophotometrie

Das Eluat wird mit 5 ml Boratpuffer pH 10,5 für 5 Minuten ausgeschüttelt, die Phasen werden durch 5-minütige Zentrifugation bei 4000 RPM getrennt und der Überstand (Boratpuffer) mit einer Einmalpipette in ein Reagenzglas überführt. 3 ml des Überstandes werden in eine Quarzküvette (d = 1 cm) dekantiert. Bei dem vorgegebenen pH von 10,5 (Boratpuffer) wird mit dem UV-Photometer die Extinktionskurve über einen Wellenlängenbereich von 360 - 220 nm aufgezeichnet. Der Schreiber wird in die Ausgangsposition zurückgestellt und die Probe mit konzentrierter Natronlauge titriert bis ein pH-Wert über 13 erreicht ist (pH-Teststäbchen Alkalit^R). Die erneute Extinktionsmessung erfolgt wie beschrieben. Die Differenz der Extinktionswerte bei 260 nm ist ein Maß für die vorhandene Barbituratmenge. Als Leerwert wird die Extinktion von reinem Boratpuffer bei 260 nm genommen.

Die Analysen erfolgen auf einem UV-Spektralphotometer der Fa. Beckman, U.S.A., Model 25. Die für die Analyse eingestellten Parameter sind: Extinktionsbereich 1 A, Wellenlängenänderung 100 nm/min, Papiervorschub 5 inch/min.

5.2.5. Gaschromatographie

Da Barbiturate in alkalischer Lösung instabil sind, wird der Inhalt des Reagenzglases sofort nach Zugabe der Probe aus der Quarzküvette mit Schwefelsäure bis zu einem pH-Wert unter 3 titriert (pH-Meßstäbchen Acilit^R).

Die angesäuerte Probe wird anschließend dreimal mit 3 ml Diethylether/Ethylacetat 1:1 ausgeschüttelt, die Überstände in ein gemeinsames Reagenzglas überführt und am Rotavapor bei 60°C Wassertemperatur im Luftstrom zur Trockne eingeeengt. Zum Einspritzen in den Gaschromatographen wird die getrocknete Probe in 200 µl 96 % Ethanol gelöst. Die Injektionsmenge beträgt jeweils 1 µl (Hamilton Spritze).

Wir führen die Analysen durch auf einem Gaschromatographen der Fa. Hewlett and Packard Nr. 5830 A, der ausgestattet ist mit einem stickstoffempfindlichen Flammenionisationsdetektor. Die Glassäule (4 feet x 2 mm i. d.) ist gepackt mit 3 % OV 17 auf Chromosorb WHP (100/200 mesh). Als Trägergas verwenden wir Helium. Die Analyse erfolgt bei isothermem Programm (240°C).

Anmerkung: Silylierung und Konditionierung der Säule

Um die Adsorption der Barbitursäuren an die Säulenwand zu unterdrücken, beschicken wir bei Herstellung der Analysensäule diese für 1 min mit Sylon T, spülen anschließend mit Toluol und Methanol und durchblasen sie mit Stickstoff. Erst jetzt erfolgt die Füllung der Säule. Die Konditionierung der Säule wird durchgeführt durch Aufheizen von 50° auf 200°C mit einer Rate von 0,5°C/min und nachfolgendem Durchheizen bei 280°C für 5 Stunden.

5.2.6. Identifizierung

Wir erreichen die Identifizierung einer Substanz über die Berechnung ihres KOVATschen Index. Den substanz-spezifischen Retentionsindex und damit einen Hinweis auf die Identität einer beliebigen Substanz erhält man durch Interpolation zwischen den Indices der beiden Substanzen, zwischen denen diese Verbindung im Gaschromatogramm erscheint. Die Berechnung erfolgt mit der Formel:

$$RI = (I_2 - I_1) \times \frac{\log \frac{t_x}{t_1}}{\log \frac{t_2}{t_1}} + I_1$$

RI Retentionsindex der gesuchten Substanz

I₁ Retentionsindex des im Chromatogramm vor der gesuchten Substanz erscheinenden Standards

I₂ Retentionsindex des im Chromatogramm nach der gesuchten Substanz erscheinenden Standards

t_x Retentionszeit der gesuchten Substanz

t₁ Retentionszeit des ersten Standards

t₂ Retentionszeit des zweiten Standards

Die Retentionsindices sind für isotherme Verhältnisse definiert und spezifisch für das verwendete Säulenmaterial (7).

Die Bedingungen entsprechen einem Vorschlag der Arbeitsgruppe für analytisch-technische Entwicklungen der Senatskommission für klinisch-toxikologische Analytik der DFG im Juni 1980. Die gaschromatographische Analyse erfolgt auf den Phasen OV 1, OV 17 und OV 225 mit Temperaturprogrammierung von 100° bis 280°C.

Das von uns benutzte Suchprogramm für Barbiturate ist:

TEMP 1	120
TIME 1	0.0
RATE	20.0
TEMP 2	280
TIME 2	20.0
INJ TEMP	250
FID TEMP	300

Da die von uns erhaltenen Retentionsindices des Standardgemisches nur geringfügig von denen für isotherme Verhältnisse bestimmten Retentionsindices (7) abweichen, ziehen wir letztere zur Identifizierung heran. Obwohl die Sicherheit der eindeutigen Zuordnung von errechnetem Retentionsindex und Substanz mit der Anzahl der verwendeten Säulen zunimmt, setzen wir zur Analyse nur zwei Säulen ein (OV 1 und die polarere OV 17), da in der Praxis ein Gaschromatograph nur mit zwei Säulen ausgestattet ist und ein Säulenwechsel problematisch und zeitraubend ist.

Nach Identifizierung der in der Probe vorliegenden Substanz(en) über KOVATS-Indices lassen wir zur Absicherung der Befunde bei gleichem Temperaturprogramm die Reinsubstanz(en) laufen.

5.2.7. Quantitative Bestimmung

UV-Photometrie:

Die Absorptionsspektren werden bei pH-Werten der Proben von 10,5 und 13 im Wellenlängenbereich 360 - 220 nm aufgezeichnet. Bei zu hohen Extinktionswerten wird die Probe in einem festen Verhältnis verdünnt, die Verdünnung geht in die Berechnung mit ein. Die der Probe zur Alkalisierung zugegebene Menge Natronlauge ist so gering, daß die Volumenänderung unberücksichtigt bleiben kann. Unter der Voraussetzung, daß eine typische Barbituratkurve vorliegt (keine Störsubstanzen), ist die Absorptionsdifferenz bei 260 nm direkt proportional der Barbituratkonzentration.

Die Berechnung der Konzentration erfolgt mit der Formel:

$$\text{Konzentration (mg/l)} = \frac{\Delta E \times 5 \times 20}{z \times p}$$

ΔE Extinktionsdifferenz bei 260 nm

z Barbituratfaktor

p Menge an eingesetzter Probe

Bestimmung des Barbituratfaktors:

Es wird eine 20 mg/l-Lösung aus der Reinsubstanz des Barbiturates hergestellt und von 360 - 220 nm photometriert.

z. B.: 100 μ l einer 1 g/l-Stammlösung von Cyclobarbitol werden zu 5 ml Leerblut gegeben (jeweils doppelter Probenansatz). Die gemessene Extinktionsdifferenz beträgt 0,21.

Der Faktor errechnet sich zu

$$20 \text{ mg/l} = \frac{0,21 \times 5 \times 20}{z \times 5}$$

Weitere nach Boratpufferextraktion (für unsere Methode) bestimmte Faktoren:

Cyclobarbitol 0,21

Pentobarbital 0,20

Phenobarbital 0,28

Die in der Literatur aufgeführten Faktoren liegen meist höher (z. B. Phenobarbital 0,36). Dies ist auf die vollständigere Extraktion der Barbiturate bei pH 13 mit Natronlauge (in der bei GOLOBAUM (37) üblichen Vorschrift) zurückzuführen.

Die Voraussetzungen zur genauen photometrischen Bestimmung sind das Vorliegen nur eines Barbiturates in der Probe und dessen Identifikation (durch in unserer Methode Gaschromatographie).

Gaschromatographie:

Unsere gaschromatographische Konzentrationsberechnung stützt sich auf den Vergleich der Peakhöhen von gesuchter Substanz und internem Standard. Da wegen der Interferenz des Lösungsmittelpeaks die Angaben des Integrators verfälscht sein können, messen wir die Peakhöhen manuell aus. Dazu ziehen wir eine Gerade durch die Basislinie und errichten darauf die Senkrechte durch die Peakspitze.

Berechnung:

Mit der Berechnung des Verhältnisses der Peakhöhen Barbiturat : Standard erhält man einen Wert, der abhängt von der Menge des Barbiturates und mit dessen Konzentration linear zunimmt.

Wir führen eine Testanalyse durch und bestimmen bei bekannter Barbituratkonzentration das Peakhöhenverhältnis. Die gesuchte Konzentration errechnet sich zu:

$$\text{Konzentration (mg/l) (Probe)} = \frac{\text{Konzentration x Peakhöhenverhältnis (Test) (Probe)}}{\text{Peakhöhenverhältnis (Test)}}$$

Ermittlung über Eichgeraden:

Zur Erstellung einer Eichgeraden werden ansteigende Mengen des identifizierten Barbiturates zu 5 ml Leerblut gegeben. Die Proben werden entsprechend verarbeitet und die Verhältnisse der Peakhöhen Barbiturat : Standard in einer Regressionsgeraden gegen die jeweiligen Konzentrationen der Barbituratproben aufgetragen.

Das Peakhöhenverhältnis der untersuchten Probe ist in die Regressionsgleichung einzusetzen.

Anmerkung

Eine Probe des zur Herstellung der Eichlösungen verwendeten Leerblutes wird vor dem Analysenansatz analysiert, um das Vorliegen von Verunreinigungen im Absorptionsbereich der Barbiturate und an der Stelle des zu erwartenden Barbituratpeaks auszuschließen.

6. ERGEBNISSE

6.1. Ermittlung von Barbituratkonzentrationen anhand gaschromatographisch gewonnener Eichkurven

Wir stellen Proben aus Leerblut her mit ansteigenden Konzentrationen der von uns identifizierten Barbiturate. Außerdem erstellen wir eine Probenreihe mit Phenobarbital, da dieses in Untersuchungen das häufigst verwendete Barbiturat ist. Die Proben werden wie beschrieben bearbeitet und die Peakhöhenverhältnisse: untersuchtes Barbiturat/Methohexital berechnet.

Eichproben 1: Cyclobarbital

Konzentrationen der Ausgangslösungen Methohexital 1 g/l
Cyclobarbital 1 g/l

Probenansatz	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
Cyclobarbital (ul)	250	500	750	1000	2000
Methohexital (ml)	jeweils 1				
Peakhöhenverhältnis	2,79	6,75	9,10	16,28	38,00

a) Konzentrationsberechnung

250 ul Cyclobarbital entsprechen bei einer Konzentration der Ausgangslösung von 1 g/l einer Menge von 250 ug. Der Faktor errechnet sich in der Probe (1) zu $2,79 : 250 = 0,0112$, d. i. ein Ausschlag von 0,0112 relativen Einheiten/ug Barbiturat. Der Mittelwert der Faktoren aus allen fünf Proben ist 0,0144/ug. Die Konzentration von Cyclobarbital in einer Probe ist

$$\text{Konzentration (mg/l)} = \frac{\text{Peakhöhenverhältnis} \times \text{ug}}{0,0144 \times 5 \text{ ml}}$$

b) Graphische Auswertung der Chromatogramme

Die Peakhöhenverhältnisse werden gegen die jeweilige Barbituratkonzentration aufgetragen. Die Geradengleichung für Cyclobarbitol lautet

$$y = 0,1x - 3,93$$

y = Peakhöhenverhältnis Cyclobarbitol/Methohexital

x = gesuchte Konzentration (mg/l)

Standardabweichung s = +/- 0,95

Korrelationskoeffizient r = 0,99

Eichproben 2: Barbitol

Konzentrationen der Ausgangslösungen Methohexital 1 g/l
Barbitol 1 g/l

Probenansatz	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
Barbitol (ul)		siehe Eichproben 1			
Methohexital (ml)					
Peakhöhenverhältnis	6,89	13,65	15,65	32,29	50,32

a) Berechnungsfaktor für Barbitol 0,0267

b) Geradengleichung für Barbitol $y = 0,13x + 0,93$

Standardabweichung s = +/- 2,36

Korrelationskoeffizient r = 0,98

Eichproben 3: Hexobarbital

Konzentrationen der Ausgangslösungen Methohexital 1 g/l
Hexobarbital 1 g/l

Probenansatz	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
Hexobarbital (ul)		siehe Eichproben 1			
Methohexital (ml)					
Peakhöhenverhältnis	3,35	5,55	9,35	12,05	22,00

a) Berechnungsfaktor für Hexobarbital 0,0121

b) Geradengleichung für Hexobarbital $y = 0,05x + 0,86$

Standardabweichung s = +/- 2,41

Korrelationskoeffizient r = 1

Lichproben 4: Phenobarbital

Konzentrationen der Ausgangslösungen					Methohexital 1 g/l
					Phenobarbital 10 g/l
Probenansatz	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
Phenobarbital (ul)	20	60	100	200	400
Methohexital (ul)	jeweils 500				
Peakhöhenverhältnis	3,70	16,50	27,85	47,20	84,75

- a) Berechnungsfaktor für Phenobarbital 0,047
(in der Berechnung ist die nur halbe Methohexitalkonzentration berücksichtigt)
- b) Geradengleichung für Phenobarbital $y = 0,21x + 3,71$
Standardabweichung $s = +/- 4,34$
Korrelationskoeffizient $r = 1$

PLASMAKONZENTRATIONEN
CYCLOBARBITAL/METHOHEXITAL

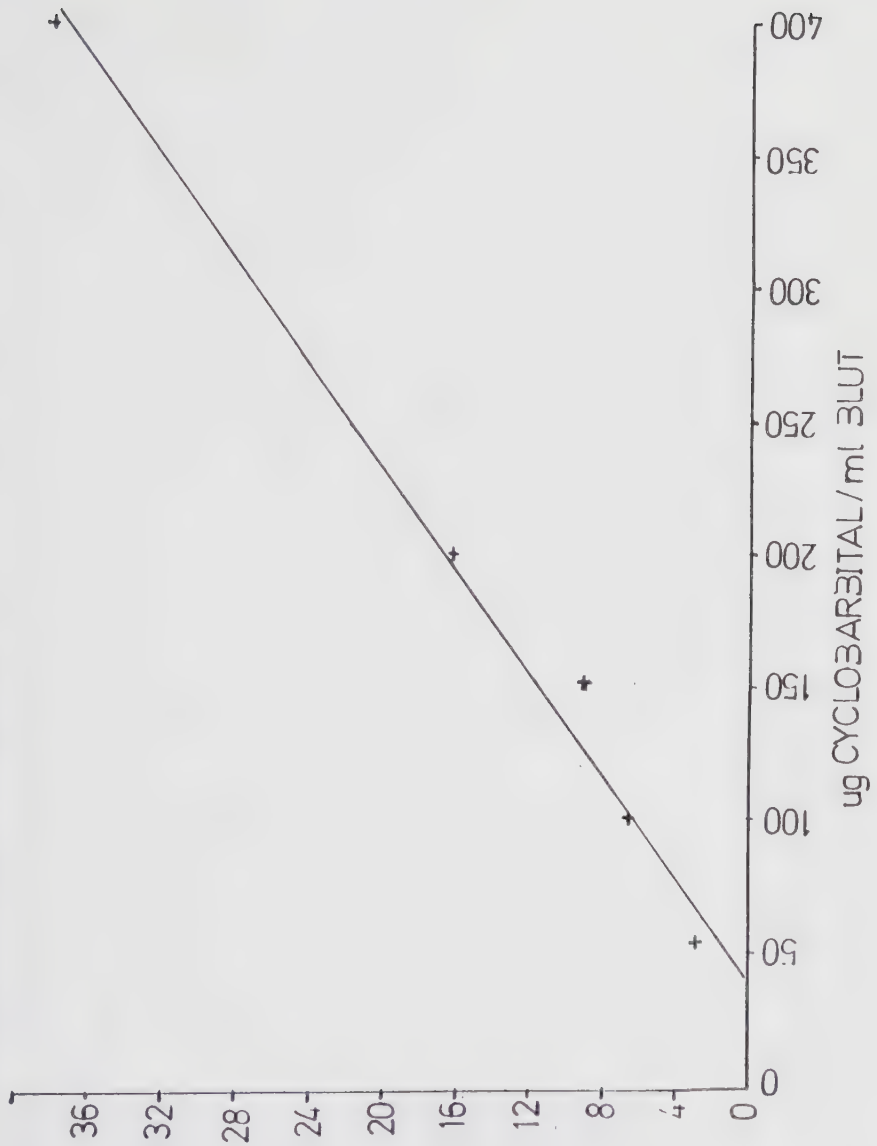


Abb. 11: Regressionsgerade von Cyclobarbital

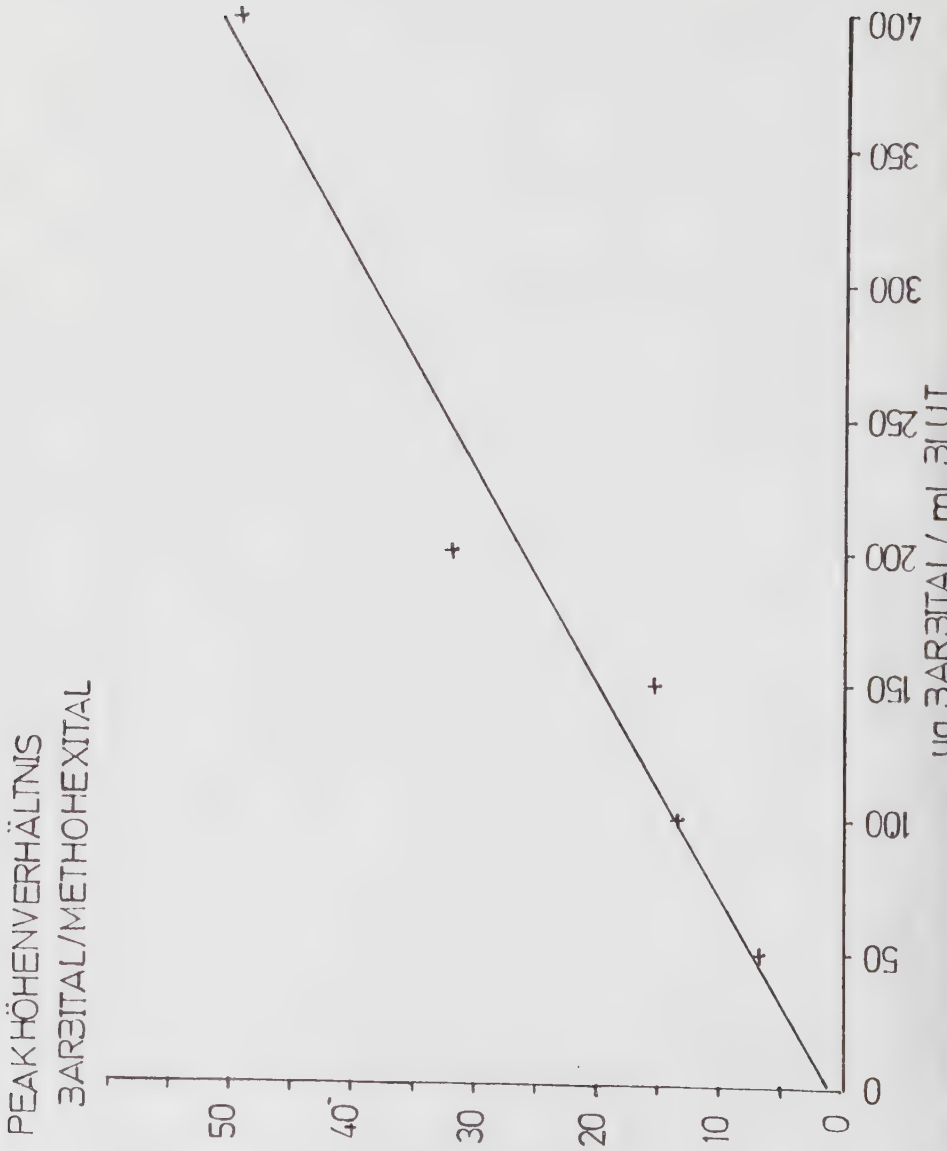


Abb. 12: Regressionsgerade von Barbitol

HEXOBARBITAL/METHOHEXITAL

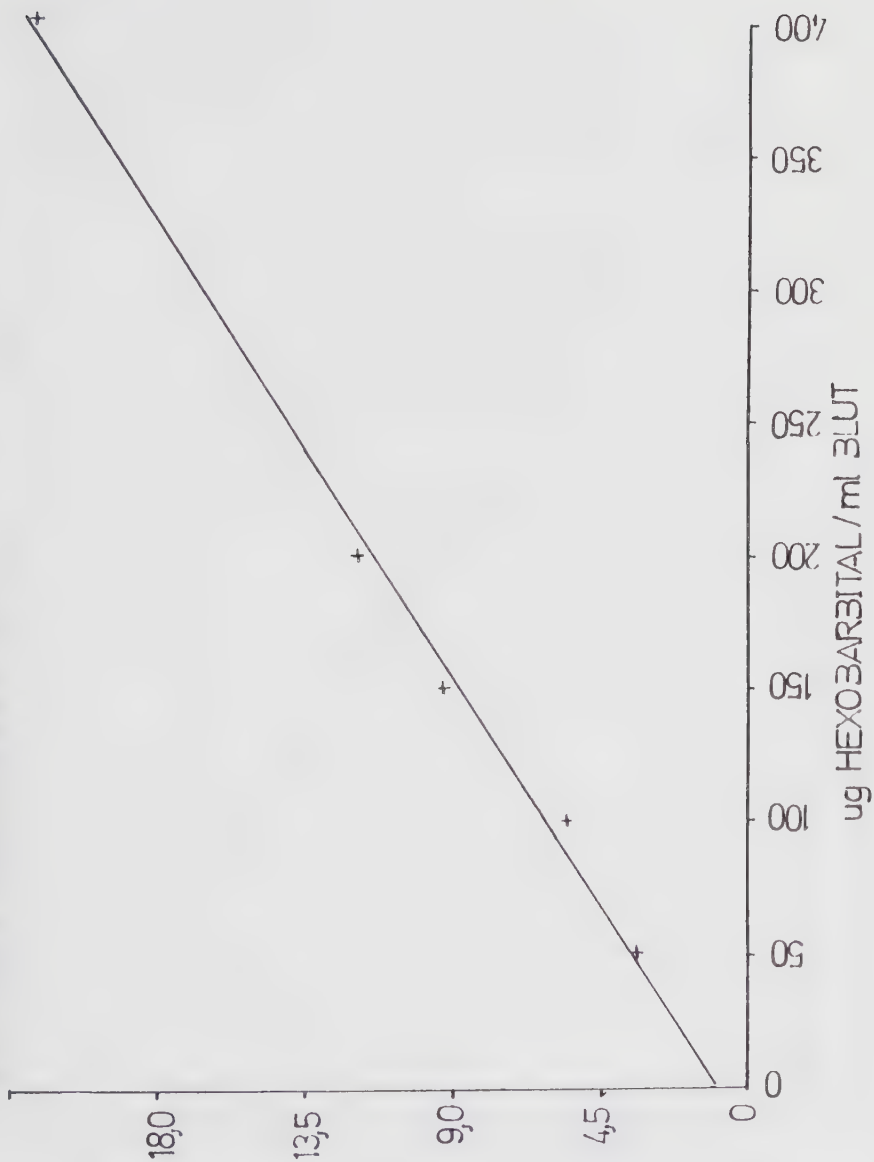


Abb. 13: Regressionsgerade von Hexobarbital

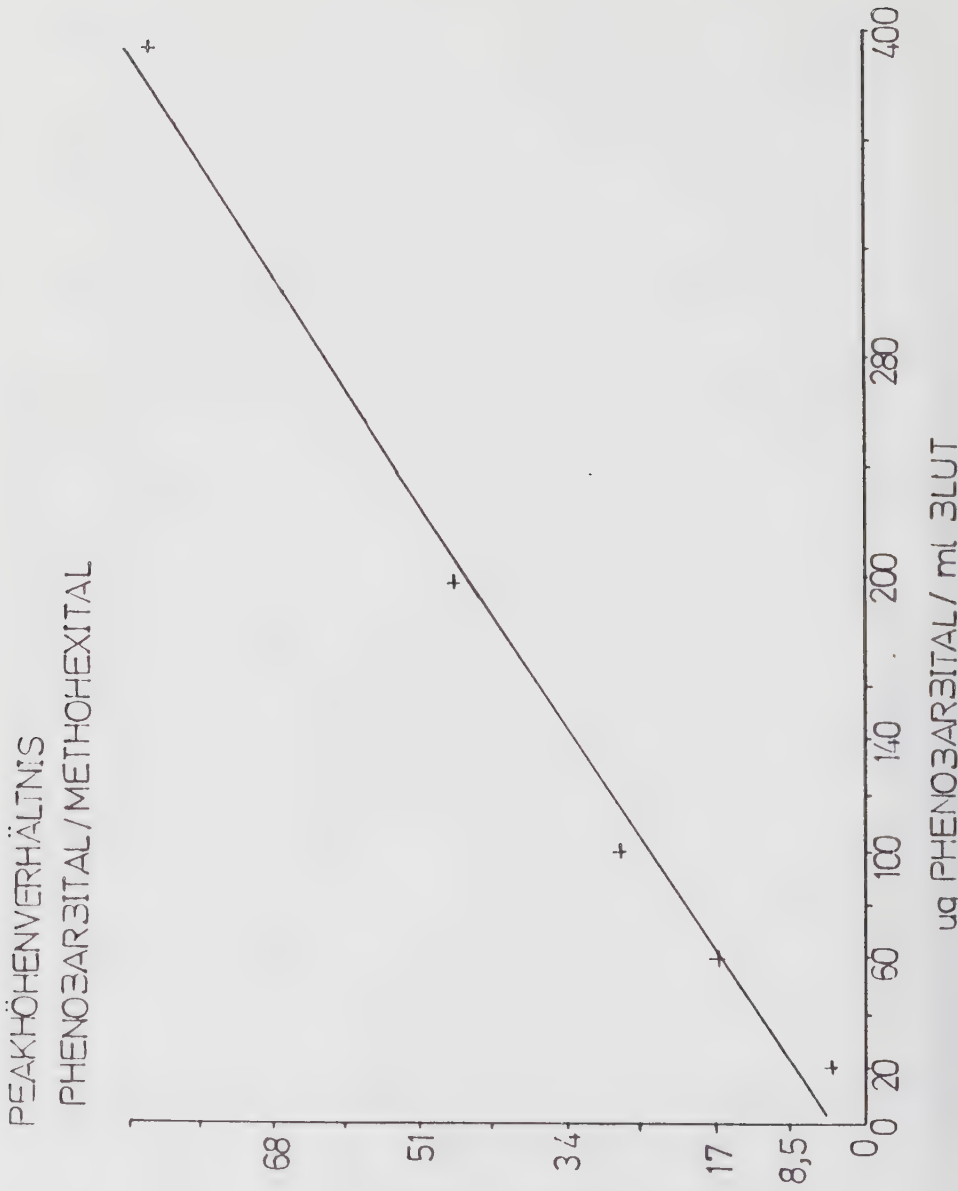


Abb. 14: Regressionsgerade von Phenobarbital

5.2. Überprüfung der photometrischen Genauigkeit

Zur Überprüfung der Genauigkeit photometrisch gewonnener Ergebnisse analysieren wir die zur gaschromatographischen Erstellung von Eichkurven vorbereiteten Probelösungen.

Beispiel: Ansteigende Mengen Phenobarbital werden zu 5 ml Leerblut gegeben und wie beschrieben extrahiert. Zur Berechnung der Konzentration wird die Extinktionsdifferenz bei 260 nm multipliziert mit dem Barbituratfaktor. Dieser beträgt für Phenobarbital in unserer Methode 0,31.

Probe	Phenobarbital-Konzentration mg/l	Extinktionsdifferenz bei 260 nm	errechnete Konzentration mg/l
(1)	20	0,31	20,0
(2)	60	0,95	61,3
(3)	100	0,53 Verd. 1:2	102,6
(4)	200	1,16 Verd. 1:2	224,5
(5)	400	1,14 Verd. 1:4	367,7

6.3. Anwendung unserer Methoden auf Fallbeispiele

Es folgt die Darstellung der Einzelfälle, jeweils mit aus den Polizeiberichten entnommenen Begleitumständen des Todes, einer Kurzfassung des Sektionsbefundes und, soweit vorhanden, den toxikologischen Untersuchungsergebnissen des Rechtsmedizinischen Institutes München.

Abkürzungen: RF Röntgenfluoreszenz
DS Dünnschichtchromatographie
GC Gaschromatographie
MS Massenspektrographie
EI Enzymatisch-immunochemische Analyse

Im Anschluß daran werden die von uns bestimmten Blut- und Organspiegel des identifizierten Barbiturates wiedergegeben.

Fall 1:

W., L. - geb. 18.1.59

Tox.-Nr. 1585/81

GS.-Nr. 572/81

Polizeibericht: AZ 120 uJs. 479/81

Herr W. wurde am 10.4.81 um 13.30 bewußtlos im Wald aufgefunden. In seiner Nähe lagen eine gefüllte Einwegspritze und eine Anzahl loser Tabletten. W. verstarb auf dem Transport ins Krankenhaus.

Todeszeit: 10.4.81 gegen 14.00

Sektion: 14.4.81 (die Leiche wurde zwischenzeitlich in einem Kühlraum des Klinikums Großhadern aufbewahrt)

Sektionsbefund:

Einziger auffälliger Befund waren "Einstichstraßen" an beiden Unterarmen.

Toxikologische Untersuchungsergebnisse:

Magen	RF	540 mg Brom/l
	DS	Barbiturat, Carbromal
	GC	1,27 g/l Carbromal, 10 mg/l Bromdiethylacetamid (Carbromalmetabolit)
Herzblut	RF	73 mg/l Brom
	EI	Barbiturat
	DS	Barbiturat, Carbromal
	GC	44 mg/l Phenobarbital, 13 mg/l Carbromal, 9 mg/l Metabolit
	MS	Cyclobarbital
Urin	RF	60 mg/l Brom
	EI	Barbiturat
	DS	Barbiturat, Carbromal
	MS	Cyclobarbital
	GC	8,3 mg/l Carbromal, 9 mg/l Metabolit
Einstichstelle (Citratblut aus Großhadern)		
	DS	Barbiturat, Pentazocin
	EI	Barbiturat
	RF	63 mg/l Brom
	GC	78 mg/l Barbiturat

Toxikologische Beurteilung:

Es wurden Cyclobarbital, Meprobamat, Carbromal und Pentazocin nachgewiesen. Carbromal wurde oral (in deutlich höherer als therapeutischer Dosis) zugeführt, Cyclobarbital und Pentazocin intravenös. Das Barbiturat ist für sich allein schon für den Tod verantwortlich. Die Wirkungen der verschiedenen Medikamente verstärken sich gegenseitig. (Cyclobarbital, Meprobamat, Carbromal und Hexobarbital finden sich in Somnupan^R).

Unsere Ergebnisse:

Unter Verwendung von KOVATS-Index und im Vergleich mit der Reinsubstanz konnten wir gaschromatographisch Cyclobarbital identifizieren.

Photometrie:

	Extinktions- differenz	Konzentration (mg/l bzw. mg/kg)
Blut	1,61	155,8
Leber	3,41	331,1
Lunge	1,75	169,9

Gaschromatographie:

	Peakhöhen- verhältnis	Konzentration (mg/l bzw. mg/kg)
Blut	12,65	175,7
Leber	27,89	386,9
Lunge	11,17	155,1

Fall 2:

B., M. - geb. 26.1.40

GS.-Nr. 715/81

Polizeibericht: AZ 120 uJs 625/81 MU 1

Ein Nachbar verständigte nach Auffinden der bewußt-
losen Frau sofort die Polizei. Nach ihrer Einliefe-
rung um 13.00 ins KH München-Harlaching verstarb
Frau B. um 13.10 infolge Barbituratvergiftung,
Schockzustand und Nierenversagen.

Todeszeit: 9.5.81 gegen 13.10

Sektion: 12.5.81

Sektionsbefund:

Als Todesursache ist eine beiderseitige Lungenembo-
lie anzusehen. Im Bereich des Herzbeutels findet sich
eine fibrinöse Entzündung. Der Mageninhalt ist weiß-
lich-schlierig, wie nach Tabletteneinnahme. Im Be-
reich der Oberhaut sind blasige Abhebungen zu sehen.

Toxikologische Untersuchung: nicht angeordnet

Unsere Ergebnisse:

Wir konnten Barbital identifizieren.

Photometrie:

	Extinktions- differenz	Konzentration (mg/l bzw. mg/kg)
Blut	0,50	20,8
Leber	0,41	17,1
Lunge	0,54	22,5

Gaschromatographie:

	Peakhöhen- verhältnis	Konzentration (mg/l bzw. mg/kg)
Blut	3,68	26,8
Leber	2,31	17,3
Lunge	3,08	23,1

Fall 3:

K., K. - geb. 11.1.30

Tox.-Nr. 826/81

GS.-Nr. 154/81

Polizeibericht: AZ 30 uJs 754/81 TS

Nach familiärem Streit ging Frau K. um 20.30 ins Bad, um 21.20 erfolgte das letzte Gespräch mit dem Ehemann. 5 Minuten später wurde sie in ihrem Bett reaktionslos aufgefunden. Um 21.55 konnte der ein-treffende Arzt nur noch den Tod feststellen. Frau K. nahm seit 6 Wochen unregelmäßig Schlaftabletten. Im Zimmer fand sich eine leere Kognakflasche und mehrere Tablettenschachteln, darunter Somnibel^R mit 1 1/2 leeren Tablettenstreifen.

Todeszeit: 1.2.81 gegen 21.30

Sektion: 2.2.81

Sektionsbefund:

Im Magen, Duodenum und in der rechten Bronchie kommen abgrenzbare Tablettenreste zur Darstellung. In der linken Ellenbeuge ist eine punktförmige Hautdurchtrennung auffällig. Fleckförmige Hautveränderungen (wie bei Barbituratvergiftung) finden sich im Bereich der Unterschenkel und der Ferse.

Toxikologische Untersuchung:

Magen	RF	Brom
	DS	2 Barbiturate, Bromharnstoffderivat, basische Arzneimittel
	GC	Hexobarbital, Cyclobarbital, Meprobamat, Methaqualon, Zerfallsprodukte von Carbromal
Herzblut	RF	7 ug/l Brom
	DS	Barbiturate, basische Verbindungen
	EI	Barbiturate, Benzodiazepinderivate
	GC	Cyclobarbital

Toxikologische Beurteilung:

Frau K. hat vor Eintritt ihres Todes oral Arzneimittel aufgenommen, davon Barbiturate in deutlich mehr als therapeutischer Dosis. Die Konzentration von Cyclobarbital allein ist schon geeignet, den Eintritt des Todes zu erklären. Ebenso wurde Carbromal in mehr als therapeutischer Dosis aufgenommen, aber nur mehr gering resorbiert.

Unsere Ergebnisse:

Mit Sicherheit konnten wir nur die Anwesenheit von Cyclobarbital verifizieren.

Photometrie:

	Extinktions- differenz	Konzentration (mg/l bzw. mg/kg)
Blut	1,35	130,6
Leber	1,89	183,0
Lunge	3,70	334,9

Gaschromatographie:

	Peakhöhen- verhältnis	Konzentration (mg/l bzw. mg/kg)
Blut	16,20	225,0
Leber	55,50	770,8
Lunge	57,70	801,4

Fall 4:

R., A. - geb. 5.12.30

GS.-Nr. 823/81

Polizeibericht: AZ 120 uJs 695/81 MÜ 1

Herr R. wurde am 29.5.81 um 13.45 tot in seinem Schlafzimmer aufgefunden. Er war am Vorabend um 23.00 zu Bett gegangen. Als Hinweise für Tablettenintoxikation fanden sich 5 leere Tablettenschachteln Somnupan^R zu je 20 Tabletten, von denen ca. 30 fehlten, sowie reichlich eingetrocknete Tablettenreste am Kopfkissen und Schlafanzug.

Todeszeit: 29.5.81 zwischen 0.00 und 6.00

Sektion: 2.6.81

Sektionsbefund:

Im Magen findet sich körnchenartiges Material wie von Tablettenresten. Der Tod trat durch Aspiration ein. Nebenbefundlich ergibt sich eine Leberverfettung mit Verdacht auf chronischen Alkoholismus.

Toxikologische Untersuchung: nicht angeordnet

Unsere Ergebnisse:

Gaschromatographisch konnten wir Cyclobarbital und Hexobarbital nachweisen.

Cyclobarbital

Photometrie:

	Extinktions- differenz	Konzentration (mg/l bzw. mg/kg)
Blut	0,29	28,2
Leber	0,81	78,2
Lunge	1,17	113,6

Gaschromatographie:

	Peakhöhen- verhältnis	Konzentration (mg/l bzw. mg/kg)
Blut	3,35	47,9
Leber	11,00	152,8
Lunge	14,20	197,2

Hexobarbital

Gaschromatographie:

	Peakhöhen- verhältnis	Konzentration (mg/l bzw. mg/kg)
Blut	0,32	5,3
Leber	0,75	12,4
Lunge	2,25	37,2

7. DISKUSSION

7.1. Extraktion

7.1.1. Extraktion underivatisierter Barbiturate

Um in der toxikologischen Analyse möglichst einfach verfahren zu können, haben wir versucht, durch Verbesserung des gaschromatographischen Systems den Schritt der Derivatbildung zu vermeiden. Der direkt, ohne Alkylierung gewonnene Extrakt kann außerdem zur Untersuchung auf andere Stoffgruppen verwendet werden.

7.1.2. Reinheit des Säulenharzes

Das von uns verwendete Extrelut^R-Säulenharz ist imprägniert und bedarf keiner vorhergehenden Aufbereitung durch Säuberung. Ebenso ist das für die Säulenwände verwendete Polyethylen von besonderer Qualität (15).

Die Säuberung des von uns benutzten XAD - 2 Harzes erfolgt durch Methanolwaschung im Soxhlett-Apparat.

7.1.3. Harzmenge bei XAD - 2 Extraktion

Wenn IBRAHIM et al. (41) zur Extraktion von 500 g Gewebe nur 2 g Harz ausreichen, so dürften die von uns eingesetzten 5 g Harz die vollständige Adsorption von Barbituraten auch in den Fällen gewährleisten, wo sehr hohe Gewebsspiegel vorliegen (wie bei chronischer Einnahme). Die Übereinstimmung von photometrisch und gaschromatographisch bestimmter Konzentration im Lebergewebe von W. L. bei einem Cyclobarbitalspiegel von über 300 mg/l bestätigen dies. Zudem füllt ein Harzvolumen von 5 g genau den schmalen unteren Teil des XAD-Säulchens und bietet damit die für dieses Säulchen größtmögliche Kontaktfläche für das Elutionsmittel.

Ein weiterer Grund für die größere Harzmenge ist methodisch bedingt: Da wir ohne proteinfällende Maßnahmen arbeiten, würden die im Homogenat vorhandenen Schlieren und Bindegewebsanteile 2 g Harz so stark verklumpen, daß die vollständige Elution der Substanzen gefährdet wäre.

7.1.4. pH-Wert bei Elution

Die bei allen Proben störungsfreien Extinktionskurven lassen sich erklären durch besondere Reinheit des Eluates nach Extraktion der Probe mit Chloroform bei einem pH-Wert von 7,4. Die Extraktion bei einem physiologischen pH-Wert vermeidet, daß Salizylate und andere stark saure Arzneimittel (u. a. auch Barbituratmetaboliten) im Eluat erscheinen (37). Damit erspart man sich zusätzliche Reinigungsschritte des Extrakts; weiterhin ist bei geringerer Verunreinigung der Probe die gaschromatographische Empfindlichkeit erhöht. Einen weiteren Vorteil bietet in diesem Zusammenhang die Extrelut^R-Säule, bei der durch die leicht alkalische Matrixoberfläche des Kieselguhrs saure Substanzen mit einem pK_s -Wert $\leq 4,5$ im unteren, erst bei der Elution benötigten Anteil der Säule readsorbiert werden (15).

7.1.5. Lösungsmittelfluß

Wir erreichen einen kontrollierten Lösungsmittelfluß durch Aufsetzen einer handelsüblichen Injektionsnadel auf das untere Ende der Extrelut^R-Säule. Bei Elution über XAD-Säulchen ist eine weitere Einschränkung der Fließgeschwindigkeit nicht nötig. Hier verzögert ein am Auslauf des Röhrchens eingesetztes Filterplättchen die Abtropfgeschwindigkeit. Oft führt sogar die Vernetzung des Harzes durch die Gewebssuspension zu einer Verstopfung der Säule.

7.1.6. Extraktion vor UV-Analyse

Im letzten Extraktionsschritt vor der Photometrie verwenden wir als Extraktionsmittel Boratpuffer pH 10,5 anstelle der von vielen Autoren eingesetzten Natronlauge (56, 16), obwohl die Barbituratextraktion bei stark alkalischem pH vollständiger wäre (Reextraktion der Barbituratsalze). Damit vermindert sich einerseits das Einschleppen stark basischer Verbindungen als Verunreinigungen, gleichzeitig erhöht sich aber auch die Stabilität der Probe, da durch die alkalische Reaktion der Salze die Hydrolyse des Barbitursäureringes gefördert wird. Dieser Faktor kann bei größerem Probenansatz eine Rolle spielen, da der letzte Schritt des Ausschüttelns und die anschließende Photometrie mit eventuell nötiger Verdünnung längere Zeit in Anspruch nimmt. Demgegenüber wird jede Probe nach Boratpufferextraktion unmittelbar vor der UV-Analyse auf pH 13 aufalkalisiert und sofort danach zur gaschromatographischen Untersuchung angesäuert.

7.2. Gewebeextraktion

Daß trotz guter Zugänglichkeit bei Autopsien diese Möglichkeit des Substanznachweises nicht routinemäßig herangezogen wird, liegt wohl zum großen Teil an den material- und zeitaufwendigen Aufbereitungsverfahren.

7.2.1. Probenmenge

Mit einem Probenbedarf von 5 g in unserer Methode (im Vergleich zu den im Literaturteil beschriebenen Mengen von z. T. 500 g (42)), ist nicht nur die Handhabung erleichtert, sondern es verringert sich damit auch die Bearbeitungszeit (Homogenisation), der Lösungsmittelverbrauch und damit auch die zum Eindampfen des Extrakts benötigte Zeit. Gleichzeitig werden die mit dem Probenmaterial eingeschleppten Verunreinigungen und Störsubstanzen entsprechend reduziert.

7.2.2. Proteinbindung

Wir verwenden die direkte Gewebsextraktion ohne deproteinisierende Maßnahmen und erreichen damit eine schnelle quantitative und qualitative Analyse. Wie an den photometrischen Ergebnissen der Phenobarbitaleichreihe ersichtlich, ist der Verlust, der auftritt durch Nichtlösen der Substanzen aus dem organischen Material, vernachlässigbar klein (es werden photometrisch 99,5 % der tatsächlich vorhandenen Konzentration bestimmt) (siehe auch (41)).

Gaschromatographisch werden Verluste durch Zugabe des internen Standards korrigiert.

Dem stehen Nachteile gegenüber, die allen Verfahren der Eiweißfällung gemeinsam sind:

Niedermolekulare Substanzen werden bei Koagulation der Proteine adsorbiert und okkludiert; damit verringern sich wiederum die Ausbeuten (97). Weiterhin können hitze- und säureempfindliche Substanzen bei der Eiweißfällung infolge Erhitzen, durch Säure oder Salz leicht zerstört werden. Mit dem schonenderen Verfahren der Subtilisinbehandlung ist allen Verfahren der hohe Zeitaufwand gemeinsam.

Die Viskosität von Blut und Gewebshomogenat vermindern wir durch Zugabe von destilliertem Wasser zur Probe in einem Verhältnis von 3:1. Im Blut tritt nach Verflüssigung Hämolyse auf, die zur Freisetzung von in Erythrozyten gebundenen Barbituraten führt. Im Gewebshomogenat bessert sich die Benetzbarkeit der Proteinbindung (65).

7.2.3. Extraktion über XAD - 2 Harz

Wir schütteln das verdünnte Organhomogenat direkt mit dem Harz aus und sparen dadurch die Zeit, die zur Zentrifugation und Filtration der Proben, um störende Gewebspartikel zu entfernen, vonnöten wäre. Schwierigkeiten treten auf bei zirrhotischem Umbau der Organe, da sich hier auch bei guter Homogenisierung immer noch festes und visköses Material in der Aufschwemmung findet, das mit dem Harz verklumpt und so den Lösungsmittefluß durch die Säule beeinträchtigt. Der Aufschluß von Lungengewebe bereitete uns größere Schwierigkeiten als der von Lebergewebe.

7.3. Photometrische Genauigkeit

Die über Extinktionsdifferenzen bestimmten Barbituratkonzentrationen der Phenobarbitaleichreihe liegen um durchschnittlich 1,79 % höher als die in den Proben vorgegebenen Konzentrationen. Die Streuung reicht von - 8,06 % bis + 2,58 %. Die Standardabweichung beträgt $s = \pm 12,85$.

7.4. Gaschromatographie

Wir verwenden die Photometrie nur zur Unterstützung der quantitativen Bestimmung von Barbituratspiegeln. Genaue qualitative und quantitative Daten erhalten wir über die Gaschromatographie, die heute bei Bestehen vieler anderer Nachweismöglichkeiten (wie Dünnschichtchromatographie, Massenspektrometrie, Hochdruckflüssigkeitschromatographie oder Immunoassay) das am häufigsten angewandte Verfahren ist.

7.4.1. Stationäre Phase

Wir verwenden zur Analyse die polare Phase OV 17 und erhalten eine gute Trennung der von uns untersuchten Barbiturate (z. B. Barbital 4.69, Pentobarbital 6.06, Phenobarbital 7.59). Die Unterscheidung Phenobarbital - Cyclobarbital ist über KOVATS-Indices nicht sicher erreichbar. Hier muß ein Vergleich mit der Reinsubstanz entscheiden. Es tritt ein leichtes Tailing der Peaks auf.

7.4.2. Interner Standard

Vor Ansetzen der Proben bearbeiten wir erst eine Blutprobe ohne Zufügen des internen Standards, um das Vorliegen einer Substanz an der Stelle des Standards auszuschließen. Außerdem kann annähernd die Konzentration der gesuchten Substanz festgestellt werden. Dies erhöht die Genauigkeit der quantitativen Bestimmung, für die eine etwa gleiche Peakhöhe von gesuchter Substanz und Standard angestrebt wird.

Die von uns bevorzugte Anwendung eines internen Standards zur quantitativen Ermittlung hat nicht nur den Vorteil des geringeren Zeit- und Materialbedarfs (als z. B. Mitführen einer Vergleichsprobe oder Einsatz radioaktiver Substanzen), sie ermöglicht auch eine präzise Quantifizierung, wenn folgende Voraussetzungen beachtet werden:

- der Standard soll ähnliche physikalische und chemische Eigenschaften wie die zu untersuchende Substanz haben
- der Standardpeak soll sich gut von den Probepeaks trennen
- der Standardpeak soll im Chromatogramm nahe den interessierenden Peaks erscheinen
- die Peakhöhen von Standard und Probe sollen etwa gleich sein
- der interne Standard soll in der Probe nicht vorhanden sein.

Wir wählen Methohexital (Brevimytal^R) als internen Standard, da dieses ultrakurz wirksame Barbiturat nicht oral, sondern nur in der Anästhesie als i.v.-Kurznarkotikum zur Anwendung gelangt und eine mißbräuchliche Einnahme daher selten ist. Der Methohexitalpeak erscheint in unserer Methode in der Mitte des Chromatogramms. Die photometrische Quantifizierung wird nicht gestört, da dieses N-methylierte Barbiturat bei der Wellenlänge von 250 nm bei pH 10 und 13 keine Maximumverschiebung zeigt. Wir fügen den internen Standard schon vor dem ersten Extraktionsschritt der Probe bei, um während der Extraktion identische Verluste von Probesubstanz und Standard zu erhalten.

7.4.3. Gaschromatographisch gewonnene Eichkurven

Die Chromatogramme der Eichproben sind durchweg genügend rein, um die Barbituratpeaks genau voneinander abzugrenzen. Mehrere zusätzliche Peaks, die auf eine Verunreinigung der Proben hindeuten, treten bei den Hexobarbitalchromatogrammen auf; sie interferieren jedoch nicht mit den Barbituratpeaks. Eine Identifikation wird nicht durchgeführt.

Es zeigt sich, daß die Ausschläge des Schreibers in den untersuchten Bereichen mit zunehmender Barbituratkonzentration linear ansteigen:

für Barbital	im Bereich 50 - 400 mg/l
Hexobarbital	50 - 400 mg/l
Cyclobarbital	50 - 400 mg/l
Phenobarbital	10 - 200 mg/l

Die toxischen Blutspiegel liegen bei Barbital um 60 - 80 mg/l (102), bei Hexobarbital um 7 mg/l (102), bei Cyclobarbital um 10 - 30 mg/l (34) und bei Phenobarbital um 40 - 60 mg/l (102).

7.5. Vergleich der gaschromatographisch und
photometrisch erhaltenen Ergebnisse

Fallbeispiele:

	Konzentration (mg/l bzw. mg/kg)		
	Gaschroma- graphie	Photo- metrie	% von Gas- chromatogr.
W. L. (identifiziertes Barbiturat:Cyclobarbital)			
Blut	175,7	155,8	89
Leber	386,9	331,1	86
Lunge	155,1	169,9	110
B. M. (Barbital)			
Blut	26,8	20,8	77
Leber	17,3	17,1	99
Lunge	23,1	22,5	98
K. K. (Cyclobarbital)			
Blut	225,0	130,6	58
Leber	770,8	183,0	24
Lunge	801,4	334,9	42
R. A. (Cyclobarbital)			
Blut	47,9	28,2	59
Leber	152,8	78,2	51
Lunge	197,2	113,6	58

In den Fällen W. L. und B. M. stimmen die mit beiden Methoden erhaltenen Ergebnisse gut überein. Die über Photometrie gemessenen Konzentrationen in Blut und Gewebe betragen 86 - 110 % der gaschromatographisch nachgewiesenen Spiegel. Die etwas niedrigere Wiederfindung in den Blutproben von B. M. kann damit erklärt werden, daß das Blut zum Zeitpunkt der Entnahme aus dem Leichenherz schon starke Gerinnelsbildung zeigte. Bei der Verarbeitung bildeten die Fibrinfäden mit dem Harz der Extraktssäule Klumpen, in denen ein Teil der Barbiturate

eingeschlossen blieb und sich nicht extrahieren ließ. In den Fällen K. K. und R. A. sind die photometrisch erhaltenen Konzentrationen wesentlich niedriger. Sie betragen in den Blut- und Organproben 42 - 59 %, bei K. K. in der Leber sogar nur 24 %. Die Extraktion aus Blut wies jedoch bei den Eichproben nie größere Unregelmäßigkeiten auf, so daß wir in diesen beiden Fällen Störsubstanzen vermuten, die zu überhöhten Ergebnissen in der gaschromatographischen Analyse führen (eventuell basische Verbindungen, wie sie in der Routinebestimmung bei K. K. nachgewiesen wurden?).

Die gleichmäßig niedrigeren Wiederfindungsraten von rund 50 % in allen Blut- und Organproben sprechen eher gegen eine mangelhafte Verarbeitung, mit Ausnahme der sehr niedrigen Ausbeute im Fall K. K. (Leber 24 %). Hier traten Schwierigkeiten in der Homogenisation und Elution der Leber auf durch eine starke bindegewebige Veränderung des Organs. In der gaschromatographischen Konzentrationsbestimmung tritt dieser Ausbeuteverlust durch Korrektur mit dem internen Standard nicht in Erscheinung (identische Verluste). Man darf also annehmen, daß in der Regel die photometrisch bestimmten Ergebnisse die tatsächlichen Blut- und Organspiegel anzeigen. Die gaschromatographisch angezeigten Konzentrationen wären in den beiden letztgenannten Fällen extrem hoch. Ausnahme bildet die Leberkonzentration bei K. K., die über den photometrischen Werten liegen dürfte.

Die Photometrie wies in allen Fällen störungsfreie Absorptionsspektren auf, auch die Chromatogramme zeigten keine groben Verunreinigungen auf, so daß die Barbituratpeaks einwandfrei ausgemessen werden konnten.

7.6. Diskussion der Fallbeispiele

Zu Fall 1: W. L.

- a) Die in der Routineanalyse bestimmte Konzentration von 44 mg/l Phenobarbital ist so zu verstehen, daß bei Nachweis eines Barbiturates die Konzentration immer in Phenobarbital angegeben wird. Die Befunde sind entsprechend zu korrigieren.
- b) Auch nach Korrektur liegen die in der Routineanalyse nachgewiesenen Probenspiegel (von z. B. 78 mg/l Barbiturat an der Einstichstelle) wesentlich niedriger als die mit unserer Methode gefundenen (z. B. 156 mg/l Cyclobarbital im Herzblut). (Diese und alle folgenden von uns erhaltenen Ergebnisse entsprechen den photometrisch gemessenen Konzentrationen.)
- c) Ebenfalls liegen unsere Daten im Vergleich zu Literaturdaten sehr hoch (in unserem Fall eine Blutkonzentration von 156 mg/l, in der Literatur wurden bei schweren Intoxikationen Blutspiegel von 10 - 30 mg/l gefunden (34)). Es gibt dafür verschiedene Erklärungsmöglichkeiten:
 - Die in der Routineanalyse nachgewiesene i.v.-Verabreichung des Medikamentes ermöglicht einen schnellen Anstieg des Barbituratspiegels (keine Begrenzung der Resorptionsgeschwindigkeit, die Ausscheidung setzt erst nach einiger Zeit ein).
 - Wie aus dem Sektionsprotokoll zu ersehen, wiesen beide Unterarme "Einstichstraßen" auf; dies läßt auf chronischen Medikamentenabusus schließen. Bei Barbituraten tritt nach längerem Gebrauch eine Toleranzbildung ein, die eine Steigerung der zur Wirkung erforderlichen Dosis nach sich zieht. Auch die letale Dosis ist dabei angehoben.

- d) Die Cyclobarbitalspiegel in Blut und Lunge sind etwa gleich hoch (Photometrie: Blut 155,8 mg/l, Lunge 169,9 mg/kg), die Konzentration in der Leber beträgt mehr als das Doppelte davon (331,1 mg/kg).

Aus diesen Konzentrationsverhältnissen könnte man schließen, daß die Ingestion des Barbiturates längere Zeit überlebt wurde, da die Leber einen höheren Spiegel aufweist als das Blut. Dies ist nach i.v.-Verabreichung des Barbiturates (das zuerst Herz, Lunge und dann gleichmäßig alle anderen Organe erreicht) nur dadurch zu erklären, daß hier sekundär eine Anreicherung des Barbiturates erfolgte. Die Akkumulation im Lebergewebe ist darauf zurückzuführen, daß diese das Hauptentgiftungsorgan im Cyclobarbitalmetabolismus darstellt (Cyclobarbital wird größtenteils metabolisiert ausgeschieden (76)).

Zu Fall 2: B. M.

- a) Wie aus Polizeibericht und Sektionsprotokoll zu erlesen sind, sind die primären Todesursachen Schockzustand und beiderseitige Lungenembolie. Damit sind die für ein toxisches Geschehen zu niedrigen Blut- und Organspiegeln in Übereinstimmung zu bringen:
Blut 20,8 mg/l, Leber 17,1 mg/kg, Lunge 22,5 mg/kg. Der niedrigste in der Literatur gefundene Blutspiegel mit Todesfolge liegt bei 32 mg/l (34). Toxische Barbitalkonzentrationen im Blut liegen durchschnittlich bei 60 - 80 mg/l (102). Für die niedrigen Barbiturat-spiegel sind folgende Erklärungen möglich:
- Der toxische Blutspiegel wurde überlebt, der Tod erfolgte im Bereich hochtherapeutischer Barbituratkonzentrationen an Lungenembolie (längere Liegezeit?, Blutstase infolge Herzschädigung?).

Die blasigen Abhebungen der Oberhaut an Auflagestellen setzen eine längere (Barbiturat-) Einwirkungszeit voraus.

- Der Tod ist zurückzuführen auf eine Mischintoxikation. Dies ist vor allem daher wahrscheinlich, da Barbital heute in medikamentöser Form als Reinsubstanz nicht mehr erhältlich ist. Eine Wirkungsverstärkung des Barbiturates ist denkbar, wenn
 - gleichzeitig Substanzen vorliegen, die denselben Angriffspunkt an der Zelle besitzen wie die Barbiturate, z. B. Alkohol, und damit therapeutische Spiegel einen toxischen Effekt haben
 - Substanzen vorliegen, die mit der Proteinbindung des Barbiturates konkurrieren, so daß ein relativ großer Teil dessen in freier Form vorliegt und damit die Wirkung einer erhöhten Dosis hat.

- b) Barbital wird nur in geringem Maße metabolisiert (3). Die Ausscheidung erfolgt größtenteils unverändert über die Niere. Die geringe Metabolisierungsrate spiegelt sich in der niedrigen Leberkonzentration wieder.

Zu Fall 3: K. K.

- a) Wir bestimmten mit unserer Methode eine höhere Konzentration an Cyclobarbital (Blut 130,6 mg/l) als sie im Routinelabor gefunden wurde (Blut 95 mg/l).
- b) Die auch im Routinelabor hohen Blutspiegelbestimmungen im Vergleich zu Literaturdaten (toxische Blutspiegel 10 - 30 mg/l (34)) legen den Verdacht auf chronische Einnahme nahe (siehe auch Polizeiprotokoll).

- c) Der Zeitabschnitt von Einnahme der Tabletten bis zum Eintritt des Todes ist mit 1 - 1 1/2 Stunden gut einzugrenzen. Die nur mehr geringe Carbromalresorption weist ebenfalls auf einen schnellen Todeseintritt hin. Damit übereinstimmend lassen sich auch die Konzentrationsverhältnisse in Blut- und Organproben deuten:
- Die Blutkonzentration liegt im toxischen Bereich (130,6 mg/l), die Leber weist wahrscheinlich das Doppelte davon auf (siehe 5.7.), die Lunge das 2 1/2-fache der Blutkonzentration auf (334,9 mg/kg). Der Todeszeitpunkt dürfte in einer relativ frühen Phase der Intoxikation liegen, die durch hohe Leber- und Lungengewebsspiegel gekennzeichnet ist.

Zu Fall 4: R. A.

- a) Die Cyclobarbitalspiegel verhalten sich in den Proben Blut - Leber - Lunge wie 1:3:4 (Blut 28,2 mg/l, Leber 78,2 mg/kg, Lunge 113,6 mg/kg). Dies könnte wieder ein Hinweis sein auf Eintritt des Todes in einem frühen Intoxikationsstadium. Ein in der Tendenz ähnliches Konzentrationsverhältnis für Hexobarbital (Gaschromatographie: Blut 5,3 mg/l, Leber 12,4 mg/kg, Lunge 37,2 mg/kg) bekräftigt diese Annahme.
- b) Unter der Voraussetzung, daß alle fehlenden Tabletten auch eingenommen wurden (30 Tabletten Somnupan^R), errechnet sich für Cyclobarbital eine Gesamtdosis von 6 g, für Hexobarbital von 4,5 g.

Anmerkung: Somnupan^R enthält in der zum Zeitpunkt der Einnahme üblichen Zusammensetzung

200 mg Cyclobarbitol
150 mg Hexobarbital
100 mg Meprobamat
100 mg Carbromal

Die zugeführte Cyclobarbitaldosis liegt damit in deutlich toxischem Bereich (minimale Letaldosis 2 g (34)), die Letaldosis von Hexobarbital allein wird deutlich unterschritten (10 g (102)). Damit übereinstimmend werden für Cyclobarbital eindeutig toxische Blutwerte gefunden, für Hexobarbital dagegen Blutspiegel, die im unteren toxischen Bereich liegen.

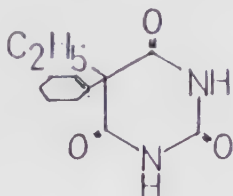
- c) Der Blutspiegel von Hexobarbital beträgt nur 1/9 des Cyclobarbitalspiegels. Dies läßt sich, neben der geringeren eingenommenen Dosis, aus der unterschiedlichen Pharmakokinetik beider Barbiturate erklären:

Hexobarbital wird infolge höherer Lipoidlöslichkeit (32) schneller aus dem Magen - Darmtrakt resorbiert und auch schneller aus dem Blut ins Gewebe aufgenommen. Das Verhältnis der Blut-: Leber-: Lungenkonzentrationen zueinander beträgt für Hexobarbital 1:2,5:7.

8. DATEN ZU DEN BEHANDELTEN BARBITURATEN

8.1. Cyclobarbital

Formel: 5-cyclohexenyl-5-ethylbarbitursäure



chemisches Verhalten:

Schmelzpunkt 170°C (75)

Löslichkeit in Teilen

Wasser	Alkohol	Ether
sehr schwer	5	20 (75)

Löslichkeit der freien Barbitursäure

in kaltem Wasser	1:800
Alkohol	1:4
Ether	1:15
Chloroform	1:20 (34)

Metabolismus: Der Hauptanteil wird in RES der Leber zu Cyclohexenonyl-Ethylbarbitursäure oxidiert, die keine narkotisch-sedative Wirkung mehr besitzt; vermutlich weitere Spaltung zu niedermolekularen Produkten (76).

Ausscheidung: Cyclobarbital wird nur in geringen Mengen unverändert eliminiert. Die Angaben schwanken zwischen 2 - 6 %, wobei die unveränderte Form etwa 2 - 4 Tage nachgewiesen werden kann (67, 75, 76). Unabhängig von der Dosis werden durchschnittlich 44 % Metabolit im Urin wiedergefunden; Metaboliten können bis zu 6 Tagen nachgewiesen werden (76).

Verwendung: Hauptsächlich Verwendung als Durchschlafmittel (55). Kurzwirksames Barbiturat (Wirkung unter 3 Stunden (38)). Cyclobarbital ist in der BRD in Kombinationspräparaten (Dolomo^R, Dormopan^R, Medinox^R) und auch als Reinsubstanz (Phanodorm^R, Itridal^R, Somnubene^R) auf dem Arzneimittelmarkt erhältlich.

Wirksame Dosis als Schlafmittel
0,2 - 0,4 g (55), minimale Letaldosis 2 g (34), oral akut tödliche Dosis 8 - 10 g (34, 55).

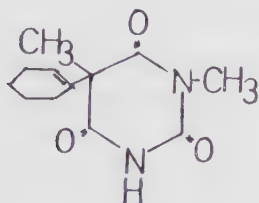
**Barbiturat-
spiegel:**

bei Intoxikationen im Blut 14 mg/l (11)
Leber 9 mg/l
Blut 51 mg/l (54)
Leber 36 mg/l

bei schweren Intoxikationen Blutspiegel von 10 - 30 mg/l. (34)

8.2. Hexobarbital

Formel: 5-cyclohexenyl-1,5-dimethyl-barbitursäure



chemisches Verhalten:

Schmelzpunkt 145°C (75)

Löslichkeit in Teilen

Wasser	Alkohol	Ether	Chloroform
sehr schwer	wenig löslich	wenig löslich	leicht löslich (75)

Löslichkeit der freien Barbitursäure

in Wasser	1:4000
95% Alkohol	1:50
Ether	1:60
Chloroform	1:6 (34)

Infolge der extrem hohen Lipidaffinität (250 x höher als bei Barbital (32)), setzt die narkotische Wirkung sofort nach Applikation ein. Die kurze Wirkungsdauer von 1 - 2 Stunden ist vor allem auf Umverteilung, weniger auf Abbau zurückzuführen (55). Daraus erklärt sich auch die hohe Akkumulationsgefahr. Für den Abbau in der Leber wurde eine Enzyminduktion nachgewiesen.

Die Halbwertszeit beträgt 4 Stunden (32). Die Bindung an Plasmaproteine ist gering (32).

Metabolismus: Der Abbau erfolgt durch Oxidation zu Cyclohexenonyl-methyl-barbitursäure mit nachfolgender Demethylierung (76). Nach 45 min liegen 90 % als Metaboliten vor (34). Das Hauptabbauprodukt besitzt keine narkotische Wirkung mehr (76).

Ausscheidung: Unabhängig von der Dosis werden im Urin etwa 26 % Metaboliten über einen Zeitraum von 24 Stunden ausgeschieden, wobei im Plasma nach 7 Stunden keine Metaboliten mehr nachweisbar sind. Die Ausgangssubstanz ist nur 8 Stunden im Urin zu finden (76). PERLIA (75) berichtet in seiner Zusammenstellung über eine unveränderte Ausscheidung von 1 - 2 % bei einer Eliminationsdauer von 24 Stunden.

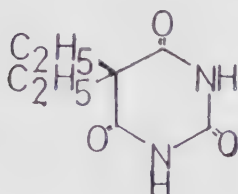
Verwendung: Hexobarbital ist ein ultrakurzwirksames Barbiturat. Es wird heute hauptsächlich neben Thiopental und Methohexital als injizierbares Kurznarkotikum verwendet (32). In Tablettenform ist es als Einschlafmittel in Gebrauch. Es ist enthalten in den Kombinationspräparaten Dormopan^R und Stodinox^R, in Evipan^R liegt es als Reinsubstanz vor. Therapeutische Dosis 0,3 - 0,5 g (55). Letale Dosis 10 g (34).

**Barbiturat-
spiegel:**

Blutspiegel therapeutisch	1 mg/l
toxisch	ab 7 mg/l
letal	ab 10 mg/l (102).

8.3. Barbital

Formel: 5,5'-diethylbarbitursäure



chemisches Verhalten:

Schmeltpunkt 190°C (75)

Löslichkeit in Teilen

	Wasser	Alkohol	Ether	Chloroform
	130	14	35	75 (75)
Löslichkeit in Wasser			1:200	
Alkohol			1:8	
Ether			1:30	
Chloroform			1:130 (34)	

Mit einem Verteilungskoeffizienten von 1 (32) ist Barbital gut lipidlöslich, woraus sich die lange Verweildauer im Körper (bis 4 Wochen (55)) und die Kumulationsgefahr bei chronischem Gebrauch versteht. Schon bei einer Einnahmedauer von mehr als 1 - 2 Wochen ergeben sich toxische Nebenwirkungen (98). Die Halbwertszeit beträgt 4 Tage (32), die Wirkdauer einer Einzeldosis 6 - 8 Stunden (55).

Bei i.v.-Gabe vergehen 22 min bis zum Bewußtseinsverlust. Die Proteinbindung ist geringer als bei anderen Barbituraten (25 - 33 %) (41).

Metabolismus: Der genaue Abbau ist unbekannt. Oxidation mit anschließender Abspaltung der Seitenketten wird angenommen (76).

Ausscheidung: Barbital wird nur in geringem Maße metabolisiert und größtenteils unverändert im Harn ausgeschieden. Nach einer Einzeldosis erscheinen innerhalb 13 Tagen 95 % unverändert im Harn (3). SCHMIDT (82) gibt eine Ausscheidungsrate von 70 - 90 % innerhalb 5 - 7 Tagen an, WILLIAMS et al. (101) beschreiben sogar einen Zeitraum von 11 Wochen für Exkretionsvorgänge.

Verwendung: Barbital wurde von CONRAD und GUTZEIT 1882 synthetisiert und fand 1903 als erstes Barbiturat Eingang in die Therapie (41). Bereits 1962 verwiesen SOEHRING und SCHMIDT darauf, daß Barbital wegen zu großer Kumulationsgefahr nicht therapeutische Verwendung finden sollte. Heute ist Barbital als Reinsubstanz (Veronal^R) nicht mehr handelsüblich, in Kanada und den USA ist es überhaupt nicht mehr erhältlich (41). Es findet sich jedoch noch in zahlreichen Kombinationspräparaten (Somnifen^R, Quadronox^R). Als kumulative Giftwirkung zeigen sich Gleichgewichtsstörungen, dauernder narkotischer Rauschzustand und in seltenen Fällen schwere Porphyrien (90).

Barbital hat die größte Einzeldosis (0,5 g), die längste Wirkungsdauer (6 - 8 Stunden) und die längste Verweildauer im Körper. Vergiftungen haben den längsten und schwersten Verlauf und die höchste Todesquote (5,8 % im Vergleich zu 1,3 % bei Hexobarbital (87)).

Barbiturat-
spiegel:

Bei 7 akuten Barbitarintoxikationen Serumspiegel von 58 - 685 mg/l; es wurden sogar Werte von 1202 mg/l überlebt (41).

3 Todesfälle mit Blutkonzentrationen von 90 - 225 mg/l und Leberkonzentrationen von 100 - 930 mg/kg (2, 3).

Blutkonzentrationen therapeutisch 10 mg/l

toxisch 60 - 80 mg/l

letal ab 100 mg/l

minimale Letaldosis 2 g, akut tödliche Dosis 5 - 10 g (34).

9. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde eine photometrische und gaschromatographische Methode zur Barbituratbestimmung aus Blut- und Gewebeprobe n ausgearbeitet.

Es werden 5 g Blut mit 15 ml destilliertem Wasser und 1 mg Methohexital als internen Standard verrührt und auf eine Extrelut^R-Säule gegeben. Entsprechende Mengen Gewebe werden unter Zusatz von destilliertem Wasser und Methohexital homogenisiert, mit 5 g gereinigtem XAD - 2 Harz vermischt, und die Aufschwemmung in ein leeres XAD-Säulchen geschüttet. Elutionsmittel ist jeweils 60 ml Chloroform.

Die Reextraktion erfolgt mit 5 ml Boratpuffer pH 10,5. Es werden Absorptionsspektren der Probe bei pH 10,5 und 13 aufgezeichnet. Unmittelbar darauf wird mit Schwefelsäure bis pH 3 angesäuert und die Probe mit 3 x 3 ml Diethylether/Ethylacetat 1:1 ausgeschüttelt. Der Extrakt wird im Luftstrom zur Trockne eingedampft, der Rückstand in 200 µl 96 % Ethanol gelöst und 1 µl davon in den Gaschromatographen eingespritzt, der ausgestattet ist mit einem N-FID und der stationären Phase OV 17.

Die Identifizierung der Barbiturate erfolgt über Kovats-Indices, die bestimmt werden durch Chromatographie auf den Phasen OV 1 und OV 17.

Die Konzentration der Barbiturate in den Proben wird berechnet mit Hilfe von gaschromatographisch gewonnenen Eichkurven, in denen die relative Peakhöhe Barbiturat/Methohexital gegen die jeweilige Barbituratkonzentration aufgelistet ist. Die photometrische Bestimmung wird erreicht durch Messung der Extinktionsdifferenz der Probe bei 260 nm (pH 10,5 und 13).

Die Eichkurven der von uns untersuchten vier Barbiturate lassen Regressionsgeraden erkennen, die mit der Konzentration linear ansteigen und, wie die Extinktionswerte der Phenobarbitaleichreihe, eine große Genauigkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse beider Untersuchungsmethoden anzeigen.

Bei Untersuchung der Fallbeispiele entsprechen sich die Ergebnisse bei zwei Fällen, bei den beiden anderen Fällen liegen die gaschromatographisch erhaltenen Probenkonzentrationen um etwa 50 % höher, so daß hier Störsubstanzen angenommen werden, die die gaschromatographischen Ergebnisse beeinflussen. Somit halten wir in diesen Fällen die photometrischen Ergebnisse für zuverlässiger. Voraussetzungen für die photometrische Konzentrationsbestimmung sind:

- die vorhergehende Identifikation des vorliegenden Barbiturates
- die Anwesenheit nur eines Barbiturates in der Probe
- eine gute Aufbereitung der Gewebeproben (gute Homogenisation)
- und störungsfreie Extinktionskurven

Unsere Methode bietet in mehreren Schritten gute Voraussetzungen für reine Extrakte; Chloroform liefert sehr reine Eluate; die Extraktion stark saurer Substanzen wird vermindert durch Elution bei physiologischem pH-Wert; das Einschleppen stark basischer Verbindungen wird vermindert durch Reextraktion mit Boratpuffer pH 10,5.

LITERATURVERZEICHNIS

1. BAILEY, D.N., JATLOW, P.I.: Parbital overdose and abuse. Amer. J. Clin. Path. 64 (1975), 291 - 296
2. BASELT, R.C., CRAVEY, R.H.: A compendium of therapeutic and toxic concentrations of toxicologically significant drugs in human biofluids. J. Anal. Tox. 1, (1977), 81 - 103
3. BASELT, R. C.: Disposition of toxic drugs and chemicals in man. Vol. 1: Centrally acting drugs. Biomedical Publication 1978, Canton, Connecticut, U. S. A.
4. BASELT, R.C., CRAVEY, R.H.: A compendium of therapeutic and toxic concentrations of toxicologically significant drugs in human biofluids. J. Anal. Tox. 1, (1977), 81 - 103
5. BASTOS, M.L.: Modifications of the XAD - 2 resin column method for the extraction of drugs of abuse from human urine. J. Chromatogr. 71, (1972), 549 - 553
6. BAYLIS, E.M., FRY, D.E., MARKS, V.: Microdetermination of serum phenobarbitone and diphenylhydantoin by gas-liquid chromatography. Clin. Chim. Acta 30, (1970), 93 - 103
7. BERNINGER, H., MÜLLER, M.R.: Retentionsindices zur gas-chromatographischen Identifizierung von Arzneimitteln. Arch. Toxikol. 37, (1977), 295 - 305
8. BERRY, D.J., GROVE, J.: Improved chromatographic techniques and their interpretation for the screening of urine from drug-dependent subjects. J. Chromatogr. 61, (1971), 111 - 123
9. BEYER, K.H.: Analytik und Biochemie toxikologisch interessierender bromierter Harnstoffderivate. Pharmaz. Zeitung 47, (1971), 1803 - 1806

10. BIER, I.: Dünnschichtchromatographische und gaschromatographische Untersuchungen zum qualitativen und quantitativen Nachweis von Carbromal. Diss. Mü. 1977
11. BOGUSZ, M., GIERZ, J., BIALKA, J.: Isolation of drugs from autopsy material by XAD - 2 adsorption-elution technique. Arch. Toxikol. 41, (1978), 93 - 102
12. BRANDT, P.: Die Dokumentation der Obduktionsfälle des Instituts für Rechtsmedizin in München unter besonderer Berücksichtigung der gewaltsamen Todesursachen. Diss. Mü 1977
13. BREIMER, D.D., ROSSUM, J.M.van.: Rapid and sensitive gaschromatographic determination of Hexobarbital in plasma of man using a nitrogen detector. J. Chromatogr. 88, (1974), 235 - 243
14. BREITER, J., HELGER, R., LANG, H.: Evaluation of column extraction: A new procedure for the analysis of drugs in body fluids. Forensic Sci. 7, (1976), 131 - 140
15. BREITER, J.: Extrelut: Four years of practice and new developments. Kontakte (Merck) 2, (1981), 21 - 31
16. BREITER, J.: Persönl. Mitteilung in der Firmenschrift Application of Extrelut, (Merck), Nr. 55
17. BROCHMANN-HANSSEN, E., BAERHEIM SVENDSEN, A.: Separation and identification of barbiturates and some related compounds by means of gas-liquid chromatography. J. Pharm. Sci. 51, (1962), 318 - 320
18. BROCHMANN-HANSSEN, E.: Gas chromatographic separation and identification of barbiturates. Theory and application of gas chromatography in industry and medicine. Hrsg. Kroman H.S. et al., Vg Grune & Stratton, New York and London, 1968, U. S. A.

19. BROCHMANN-HANSEN, E., OLAWUYI OKE, T.: Gas chromatography of barbiturates, phenolic alkaloids, and xanthine bases: Flash-heater methylation by means of trimethylanilinium hydroxide. *J. Pharm. Sci.* 58, (1969), 370 - 371
20. BROUGHTON, P.M.G.: A rapid ultraviolet spectrophotometric method for the detection, estimation, and identification of barbiturates in biological material. *Biochem. J.* 63, (1956), 207 - 213
21. BÜCH, H., KARACHRISTIANIDIS, G., PFLEGER, K., FORTH, W., WÜRNER, D.: Ein Verfahren zur routinemäßigen Bestimmung von Arzneimitteln, insbesondere von Barbituraten, bei der Schlafmittelvergiftung. *Arch. Toxikol.* 21, (1966), 216 - 224
22. BUSH, M.T., BERRY, G., HUME, A.: Ultra-short-acting barbiturates as oral hypnotic agents in man. *Clin. Pharmacol. Therap.* 7, (1966), 373 - 378
23. CHRISTOPOULOS, G.N., WU CHEN, N., TOMAN, A.J.: Separation of barbiturates and morphine analysis from putrefied post mortem tissue. *J. Chromatogr.* 106, (1975), 446 - 453
24. CIEPLINSKI, E.W.: Prevention of peak tailing in the direct gas chromatographic analysis of barbiturates. *Anal. Chem.* 35, (1963), 256 - 257
25. COOPER, R.G., GREAVES, M.S., OWEN, G.: Gas-liquid chromatographic isolation, identification, and quantitation of some barbiturates, glutethimide, and diphenylhydantoin in whole blood. *Clin. Chem.* 18, (1972), 1343 - 1349
26. CURRY, A.S.: The liver: blood ratio in cases of barbiturate poisoning. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2, (1960), 602 - 606

27. DÜNHARDT, A.: Therapie der Schlafmittelvergiftungen.
Med. Mschr. 18, (1964), 482
28. DOYLE, T.D., PROCTOR, J.B.: Effects of solvent composition on the partition of barbiturates. Journal of the AOAC, Vol. 56, No. 4, (1973), 864 - 868
29. ENDE, M., PFEIFFER, P., SPITELLER, G.: Über das Einschleppen von Verunreinigungen bei Verwendung von Extrelut^R-Fertigsäulen. J. Chromatogr. 183, (1980), 1 - 7
30. DIAGNOSTICA MERCK: Extrelut^R. Neues Verfahren zur Extraktion lipophiler Stoffe.
31. FIERECK, E.A., TIETZ, N.W.: A gas-chromatographic method for separating and measuring barbiturates and gluthetimide in blood. Clin. Chem. 17, (1971), 1024 - 1027
32. FORTH, W., HENSCHLER, D., RUMMEL, W.: Pharmakologie und Toxikologie. Bibliographisches Institut AG, Zürich 1975
33. FUJIMOTO, J.M., WANG, R.I.H.: A method of identifying narcotic analgetics in human urine after therapeutic dosis. Toxicol. Appl. Pharmacol. 16, (1970), 186
34. GADAMERS LEHRBUCH DER CHEMISCHEN TOXIKOLOGIE UND ANLEITUNG ZUR AUSMITTELUNG DER GIFTE. Hrsg. Graf & Preuß, Vg. Vandenhoeck & Ruprecht, Göttingen (1979), Band I/2
35. GELBKE, H.P., GRELL, T.H., SCHMIDT, G.: Isolation of drugs from blood by column chromatography on Amberlite XAD - 2. Arch. Toxikol. 39, (1978), 211 - 217

36. GILL, R., STEAD, A.H., MOFFAT, A.C.: Identification of drugs by the effective combination of gas-liquid, high performance liquid and thin-layer chromatographic techniques. *J. Chromatogr.* 204, (1981), 275 - 284
37. GOLDBAUM, L.R.: Determination of barbiturates. Ultraviolet spectrophotometric method with differentiation of several barbiturates. *Anal. Chem.* 24, (1952), 1604 - 1607
38. GOODMAN, L., GILMAN, A.: The pharmacological basis of therapeutics. N.Y. 1975, 5. Auflage, p. 103
39. HARRIS, I., FRASER, H.F.: Addiction to analgetics and barbiturates. *Pharmac. Rev.* 2, (1950), 2
40. HESSE, E.: Die Rausch- und Genußgifte. ENKE-Vg., Stuttgart, 2. Auflage, (1953)
41. HOLZBECHER, M., ELLENBERGER, H.A., PERRY, R.A.:
A report of a barbitol suicide and a limited study of tissue extraction procedures relative to barbitol. *Can. Soc. Forens. Sci. J.* Vol. 13, No. 4, (1980), 17 - 20
42. IBRAHIM, G., ANDRYAUSKAS, S., BASTOS, M.L.: Application of Amberlite XAD - 2 resin for general toxicological analysis. *J. Chromatogr.* 108, (1975), 107 - 116
43. ITIABA, K., CRAWHALL, J.C., SIN, C.M.: A rapid high resolution chromatographic method for serum barbiturates: Instant thin-layer chromatography. *Clin. Biochem.* 3, (1970), 287 - 293
44. JAIN, N.C.: The identification of barbiturates from biological specimens. *J. Chromatogr. Sci.* 12, (1974), 228 - 236
45. JACKSON, J.V., FINKLE, B.S.: Occurrence of pseudobarbiturates in post-mortem material. *Nature* 199, (1963), 1061 - 1063

46. KANANEN, G., OSIIEWICZ, R., SUNSHINE, I.: Barbiturate analysis - a current assessment. J. Chromatogr. Sci. 10, (1972), 283 - 387
47. KAZYAK, L., KNOBLOCK, E.C.: Application of the gas chromatography to analytical toxicology. Anal. Chem. 35, (1963), 1448 - 1452
48. KLEJIN, E. van der, BEELEN, G.C., FREDERICK, M.A.: Determination of tranquillizers by GLC in biological fluids. Clin. Chim. Acta 34, (1971), 345 - 356
49. KIELHOLZ, P., LADEWIG, D.: Die Drogenabhängigkeit des modernen Menschen. Vg. J. F. Lehmanns, München 1972
50. KÜLPMANN, W.R.: Eine einfache GC-Methode zur Bestimmung von Schlafmitteln im Serum. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 17, (1979), 115 - 121
51. KULLBERG, M.P., MILLER, W.L., MCGOWAN, F.J., DOCTOR, B.P.: Studies on the single extraction of amphetamine and phenobarbital from urine using XAD - 2 resin. Biochem. Medicine 7, (1973), 323 - 335
52. KULLBERG, M.P., GORODETZKY, Ch.W.: Studies on the use of XAD - 2 resin for detection of abused drugs in urine. Clin. Chem. Vol. 20, No. 2, (1974), 177 - 183
53. LANTZ, R.K., EISENBERG, R.B.: Evaluation of the JET technique for extracting drugs from urine. Clin. Chem. Vol. 24, No. 5, (1978), 821 - 824
54. LAST, W.: Vergleichende Untersuchungen zur Bestimmung von Cyclobarbitol in Organen und Körperflüssigkeiten. Arch. Toxikol. 19, (1961), 169 - 272
55. LAUBENTHAL, F.: Sucht und Mißbrauch. Georg Thieme Vg., Stuttgart 1964

56. LEACH, H., TOSELAND, P.A.: The determination of barbiturates and some related drugs by gas chromatography. *Clin. Chim. Acta* 20, (1968), 195 - 203
57. LEMMER, B.: Medikamentenabusus. *DIA* 12, (1979), 56 - 69
58. MACGEE, J.: Rapid identification and quantitative determination of barbiturates and glutethimide in blood by gas-liquid chromatography. *Clin. Chem.* Vol. 17, No. 7, (1971), 587 - 591
59. MACHATA, G., BATTISTA, H.J.: Gaschromatographische Barbituratbestimmung. *Mikrochim. Acta* 4, (1968), 866 - 873
60. MACHATA, G., VYCUJILIK, W.: Isolierung von Drogen aus Harz mit makroretikulären Adsorberharzen. *Arch. Toxikol.* 33, (1975), 115 - 122
61. MALKUS, H., JATLOW, P.I., CASTRO, A.: A practical routine gas chromatographic determination of phenobarbital, primidone, and diphenylhydantoin. *Clin. Chim. Acta* 82, (1978), 113 - 117
62. MARIGO, M., FERRARA, S.D., TEDESCHI, L.: A sensitive method for gas-chromatographic assay of barbiturates in body fluids. *Arch. Toxikol.* 37, (1977), 107 - 112
63. MARTIN, H.F., DRISCOLL, J.L.: Gas chromatographic identification and determination of barbiturates. *Anal. Chem.* 38, (1966), 345 - 346
64. MCMAHUS, M.E. et al.: Xenobiotic metabolism in the human lung. *Life Sci.* 26, (1980), 481 - 487
65. MEYER, L. von, DRASCH, G., KAUERT, G.: Comparison of recently developed method for liquid-solid extraction of drugs from blood. *Hrsg. A. Kovatsis: Toxicological aspects, Thessaloniki 1980*, pp. 415 - 421

66. MISSEN, A.W., LEWIN, J.F.: A non-ionic resin extraction of drugs in blood. *Clin. Chim. Acta* 53, (1974), 389 - 390
67. MOESCHLIN, S.: *Klinik und Therapie der Vergiftungen*. Thieme Vg., 5. Auflage, 1972
68. MULE, S.J., BASTOS, M.L., JUKOFSKY, D., SAFFER, E.: Routine identification of drugs of abuse in human urine. II: Development and application of the XAD - 2 resin column method. *J. Chromatogr.* 63, (1971), 289 - 301
69. NIYOGI, S.K., RIEDEHS, F.: Interfering peaks in gas chromatographic exclusion screening of direct chloroform extracts of blood. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 29, (1971), 113 - 126
70. NOVAKOVA, E., VECERKOVA, J.: Über den Thiopentalnachweis in biologischem Material. *Arch. Toxikol.* 32, (1974), 313 - 320
71. OKUMURA, K., YOSHIDA, H., HORI, R.: Tissue distribution and metabolism of drugs. III: Accumulation of drugs by the isolated perfused rat lung. *J. Pharm. Dyn.* 1, (1978), 230 - 237
72. PARKER, K.D., KIRK, P.L.: Separation and identification of barbiturates by gas chromatography. *Anal. Chem.* 33, (1961), 1378 - 1380
73. PARKER, K.D., FONTAN, Ch.R., KIRK, P.L.: Rapid gas chromatographic method for screening of toxicological extracts for alkaloids, barbiturates, sympathomimetic amines, and tranquillizers. *Anal. Chem.* 35, (1963), 356 - 359
74. PAULUS, W.: Der qualitative Barbituratnachweis in der forensischen Praxis. *Mikrochim. Acta* 38, (1951), 566 - 573

75. PERLIA, X.: Beiträge zum Nachweis therapeutisch wichtiger Barbiturate. Diss. Eidgen. T.H. Zürich 1953, Juris Vg.
76. PFEIFER, S.: Biotransformation von Arzneimitteln. Bd. 1 - 3, Vg. Chemie, Weinheim, New York 1979
77. POST, C.: Studies of the pharmacokinetic function of the lung with special reference to lidocain. Departments of Clinical Pharmacology and Anaesthesiology, Linköping 1979, Sweden
78. PRANITIS, P.A.F., MILZOFF, J.R., STOLMAN, A.: Extraction of drugs from biofluids and tissues with XAD - 2 resin. J. Forensic Sci. 19, (1974), 917 - 925
79. PRANITIS, P.A.F., STOLMAN, A.: The differential elution of drugs from XAD - 2 resin. J. Forensic Sci. 20, (1975), 726 - 730
80. ROERIG, D.L., LEWAND, D.L., MUELLER, M.A., WANG, I.H.: Comparison of radioimmunoassay with thin-layer chromatographic and gas-liquid chromatographic methods of barbiturate detection in human urine. Clin. Chem. 21, (1975), 672 - 675
81. SCHMIDT, G.: Vorgehen bei der Extraktion der Barbiturate aus Blut und Eingeweiden nach P. Valov. Industrial and Engineering Chemistry 18, (1946), 456
82. SCHMIDT, G.: Der intravitale und postmortale Abbau von Barbitalen. Arch. Toxikol. 17, (1958), 93 - 150
83. SCHWABE, U.: Jährlich 1000 Todesfälle durch rezeptfreie bromcarbamidhaltige Schlafmittel in der BRD. Dtsch. Med. Mschr. 102, (1977), 885 - 888
84. SCHWEIZER, K., WICK, H., BRECHBÜHLER, T.: An improved method for preparation of samples for the simultaneous assay of some antiepileptic drugs by gas-liquid chromatography. Clin. Chim. Acta 90, (1978), 203 - 208

85. SINE, H.E., MCKENNA, M.J., REJENT, T.A., MURRAY, M.H.:
Emergency gas-liquid chromatographic determination of barbiturates and glutethimide in serum.
Clin. Chem. Vol. 16, No. 7, (1970), 587 - 593
86. SKINNER, R.F., GALLAHER, E.G., PREDMORE, D.B.: Rapid
determination of barbiturates by gas chromatography-mass spectrometry. Anal. Chem. 45, (1973),
574 - 576
87. SOEHRING, K., SCHMIDT, G.: Diäthylbarbitursäure. MÜ.
Med. Wschr. 41, (1962), 1939 - 1940
88. STAJIC, M., CAPLAN, Y.H., BACKER, R.C.: Detection of
drugs using XAD - 2 resin. I: Choice of resin,
chromatographic conditions, and recovery studies.
J. Forensic Sci. Vol. 24, No. 4, (1979), 722 - 731
89. STAJIC, M., CAPLAN, Y.H., BACKER, R.C.: Detection of
drugs using XAD - 2 resin. II: Analysis of liver in
medical examiner's cases. J. Forensic Sci. Vol. 24,
No. 4, (1979), 732 - 743
90. STEVENSON, G.W.: Anal. Chem. 38, (1966), 1948
91. STOLMAN, A., PRANITIS, P.A.F.: XAD - 2 resin drug ex-
traction methods for biologic samples. Clin. Toxicol.
Vol. 10, No. 1, (1977), 49 - 60
92. STREET, H.V.: Determination of barbiturates in blood
by GLC. Clin. Chim. Acta 34, (1971), 357 - 364
93. STREET, H.V., VYCUJILIK, W., MACHATA, G.: Gas-liquid
chromatography of submicrogram amounts of drugs.
V: Preparation of low-activity packed columns and
their application to the toxicological analysis of
underivatized polar drugs in the low nanogram range.
J. Chromatogr. 168, (1979), 117 - 124
94. STUCKEY, R.E.: The ultraviolet absorption spectra of
barbituric acid derivatives. II: Barbitone and phenobarbitone and their methyl derivatives. Chemistry
Laboratory, Home Office Forensic Science Laboratories,
Preston, (1941), 217 - 225

95. SUNSHINE, I., MAES, R., FINKLE, B.: An evaluation of methods for the determination of barbiturates in biological materials. Clin. Toxicol. Vol. 1, No. 3, (1968), 281 - 296
96. TATUM, L.A.: The present status of the barbiturate problem. Physiol. Rev. Vol. 19, No. 39, 472 - 502
97. THOMA, J.J., EWALD, T., MCCOY, M.: Simultaneous analysis of underivatized phenobarbital, carbamazepine, primidone, and phenytoin by isothermal gas-liquid chromatography. J. Clin. Toxicol. 2, (1978), 219 - 225
98. TRENDLENBURG, P.: Grundlagen der allgemeinen und speziellen Arzneiverordnung. Vg. F.C.W. Vogel, Leipzig 1926
99. TSCHIDA, M.: Tödliche Intoxikationen in den Jahren 70 - 77. Diss. MÜ. 80
100. WERNER, M., MOHRBACHER, R.J., RIENDEAU, C.J.: Gas-liquid chromatography of underivatized drugs after chromatographic extraction from blood. Clin. Chem. Vol. 25, No. 12, (1979), 2020 - 2025
101. WILLIAMS, A.J., JONES, T.W.G., COOPER, J.D.H.: A rapid method for the determination of therapeutic barbiturate levels in serum using gas-liquid chromatography. Clin. Chim. Acta 43, (1973), 327 - 332
102. WINEK, Ch.L.: Tabulation of therapeutic, toxic, and lethal concentrations of drugs and chemicals in blood. Clin. Chem. Vol. 22, No. 6, (1976), 832 - 836
103. ZILLER, J.: Akute exogene Intoxikationen. Diss. MÜ. 1980

11. LEBENS LAUF

- | | |
|----------------------------------|--|
| 21. Oktober 1956 | geboren in Schleching als Tochter des Kaufmanns Josef Wehweck und seiner Ehefrau Cäcilia, geb. Wimmer |
| 1963 - 1968 | Besuch der Volksschule in Schleching |
| 1968 - 1977 | Besuch des Staatlichen Land-schulheims Marquartstein |
| 24. Juni 1977 | Ablegung der Reifeprüfung |
| November 1977 -
November 1983 | Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Uni-versität München |
| 2. Dezember 1983 | Erteilung der Approbation als Arzt |
| 18. Juni -
23. September 1984 | Wissenschaftliche Mitarbeiterin bei der Deutschen Herz - Kreis-laufpräventionsstudie (DHP) des Bundesgesundheitsamtes Berlin |
| 1. Oktober 1984 | Assistenzärztin an der Inneren Abteilung des Kreiskrankenhauses Prien / Chiemsee |

100

100

100

100

100

100

